

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**



**ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA**  
**INTERAÇÃO *Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei*.**

**Sizenando José de Andrade Junior**

**ILHÉUS – BAHIA - BRASIL**

**MAIO – 2008**



Sizeando José de Andrade Junior

ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO

*Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei*.

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Biotecnologia e Genômica.

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

MAIO – 2008

Sizenando José de Andrade Junior

ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO

*Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei*.

APROVADA: 30 de Maio de 2008

Prof<sup>a</sup>. PhD. Karina Gramacho  
CEPLAC

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ioná Santos Araújo  
UESC

Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias  
UESC

Prof. Dr. Abelmon Gesteira (Orientador)  
UESC

## **DEDICATÓRIA**

A minha mãe, irmãs, sobrinhos e companheira, que mesmo sem a presença física, jamais me deixaram só e a sentir falta do verdadeiro amor, a vocês razões do meu viver, dedico.

Aos verdadeiros amigos que fiz durante essa jornada, em especial a Luciana Calazans e Pelé que durante os meus dias mais difíceis aqui, os tornaram mais fáceis pela maneira carinhosa e amável que me agüentavam, ofereço.

## **AGRADECIMENTOS**

A meus orientadores Abelmon Gesteira e Dominique Garcia, pela confiança e paciência, bem como ao professor Julio Cascardo pela oportunidade;

Aos professores, Ronan Xavier, Leandro Loguércio, Martin Brendel e Cristina Pungartinik pelas discussões construtivas nas disciplinas e agradecimentos especiais aos professores Marcio Gilberto, Carlos Priminho, Fábio Gomes e Fabienne Michelli, pela ajuda em momentos que meus orientadores faltaram;

Aos amigos do programa pela boa convivência e momentos de descontração em especial, Braz; Cristiano, Maíza, Juliane, Angela, Jamile, Tahise; Graziela, Lana; e os outros que não me lembro no momento;

Aos demais colegas do programa de pós-graduação que contribuíram diretamente no desenvolvimento deste trabalho e aqueles que ajudaram somente em não atrapalhar.

Ao meu amigo-irmão Samuel Carvalho, pela amizade e fundamental ajuda nessa reta final;

Aos companheiros de laboratório, dentre eles: os técnicos; alunos de iniciação científica; e responsáveis pela limpeza;

A PMB pelo apoio ao projeto, em especial ao Saulo, Luciano, Neto e ao Carlos Matos do setor de pesquisa e desenvolvimento da PMB, pela prestatividade, hospitalidade e apoio durante a primeira parte do trabalho;

A Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação em genética e biologia molecular pela oportunidade, estrutura física e apoio logístico.

## ÍNDICE

<b>EXTRATO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Evolução das interações planta-patógeno.....	4
2.2. Sintomatologia do Mal-das-folhas.....	7
2.3. Resistência genética de <i>Hevea brasiliensis</i> ao <i>Microcyclus ulei</i>	9
2.4. Genômica nas interações planta-patógeno.....	12
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1. Identificação de genes relacionados a sinalização e defesa.....	16
3.2. Análise da expressão gênica via macroarranjos.....	17
3.2.1. Escolha dos fragmentos de interesse.....	17
3.2.1.1. Escolha dos fragmentos de interesse.....	17
3.2.1.2. Extração de DNA plasmidial.....	17
3.2.1.3. Amplificação dos fragmentos selecionados.....	18



3.2.1.4. Preparo das membranas para os macroarranjos.....	18
3.2.2. Obtenção e marcação de cDNAs alvos para hibridação.....	20
3.2.2.1. Inoculação de <i>M. ulei</i> em folíolos jovens de seringueira.....	20
3.2.2.2. Extração de RNA total.....	21
3.2.2.3. Tratamento com DNase I.....	21
3.2.2.4. Síntese de cDNA.....	21
3.2.2.5. Marcação dos cDNAs alvos.....	22
3.2.3. Hibridação dos macroarranjos.....	22
3.2.3.1 Pré-hibridação e hibridação das membranas de macroarranjo.....	22
3.2.3.2. Lavagem das membranas.....	22
3.2.3.3. Recuperação das membranas após a hibridação.....	23
3.2.4. Análise estatística das hibridações dos macroarranjos.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Identificação <i>in silico</i> de genes diferentemente expressos em <i>H.</i> <i>brasilienses</i> infectada com <i>M. ulei</i> .....	25
4.1.1. Defesa.....	25
4.1.2. Sinalização celular.....	27
4.1.3. Vias de hormônios.....	28
4.1.4. Transportadores.....	28
4.2. Análise da expressão gênica das seqüências via macroarranjos	29
4.2.1. Análise da expressão diferencial dos genes associados a respostas de defesa e estresse.....	30
4.2.2. Análise da expressão diferencial dos genes das vias de sinalização.....	31

4.2.3. Análise da expressão diferencial dos genes das vias dos hormônios .....	32
4.2.4. Análise da expressão diferencial dos genes de proteínas de transporte.....	33
5. DISCUSSÃO.....	35
5.1. Análises <i>in silico</i> de genes diferentemente expressos em <i>H. brasilienses</i> infectada com <i>M. ulei</i> , oriundos de bibliotecas SSH 4-28 d.a.i.....	35
5.2. Análise da expressão diferencial dos genes via macroarranjos.	39
5.3. Sequências diferentemente expressas na biblioteca SSH da cultivar resistente com expressão gênica significativamente distinta 10 dias após inoculação com <i>M.ulei</i> em relação a cultivar suscetível.....	43
5.4. Perspectivas.....	45
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## EXTRATO

ANDRADE JÚNIOR, Sizenando José. M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz. Março, 2008. **ANÁLISE DE GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO *Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei***. Orientador: Dr. Abelmon Gesteira. Co-orientadores: Dr. Dominique Garcia e Dr. Julio Cascardo.

O Mal-das-folhas causado pelo *Microcyclus ulei* é umas das principais doenças que afetam as plantas do gênero *Hevea* e representa uma grande ameaça à produção mundial de borracha natural. A principal alternativa para o combate a esta doença está relacionada com o melhoramento genético da seringueira em busca de clones com resistência durável. Prévios estudos de mapeamento genético e detecção de QTLs mostram que a resistência ao *M. ulei* envolve, ao menos, três regiões cromossômicas, e um melhor entendimento das bases genéticas envolvidas nessa interação, é fundamental para um efetivo combate. Uma abordagem eficiente para elucidação dos mecanismos de resistência consiste da identificação de genes diferencialmente expressos entre genótipos contrastantes para respostas ao ataque patogênico. A produção de *expressed sequence tags* (ESTs) e análises globais de transcriptomas são eficientes e poderosos meios para identificação de genes regulados por estresse biótico ou abiótico, sendo que a utilização da técnica *suppression subtractive hybridization* (SSH) tem acelerado a caracterização de genes e gerado informações de seqüências para design de micro e macroarranjos e para anotação genômica, que possibilitam à análises de interações gênicas em larga

escala. Este trabalho teve como objetivo identificar ESTs diferentemente expressos que tenham função relacionada com as respostas de defesa, a sinalização celular, transporte e as vias de hormônios, obtidos das bibliotecas SSH da interação *Hevea-Microcyclus* de 4-28 d.a.i. Foram identificados na cultivar resistente 31 seqüências com homologia a genes de defesa, 7 com homologia a genes envolvidos nas vias de hormônios, 12 com homologia a genes transportadores e 19 com genes relacionados as vias de sinalização. Na cultivar suscetível o número de seqüências diferentemente expressas foi bem menor, 4 no total, sendo: 2 apresentando homologia a genes de defesa, 1 a proteínas de transporte e 1 que estaria envolvido no aparato de sinalização; nessa cultivar não foram observadas seqüências originais às vias de hormônios. Posteriormente foram feitas análises funcionais via macroarranjos das seqüências das vias de sinalização, defesa, transporte e hormônios. Para tanto foram formados “*set unigens*” das seqüências, que foram submetidas a extrações de DNA plasmidial, reações em cadeia de polimerases para amplificação dos fragmentos de interesse e posteriormente foram denaturados por NaOH e fixados nas membranas de náilon. Os cDNAs utilizados no procedimento de hibridação foram sintetizados a partir dos transcriptomas de folhas de seringueira (do clone parcialmente resistente – MDF180, e do susceptível – PB 314) infectadas com o *M. ulei* (10 d.a.i.), que foram encaminhados para hibridação com as membranas, utilizando o Kit Alkaphos (GE Healthcare, USA). Os resultados das hibridações permitem inferir diferença significativa de expressão para 31 seqüências entre o clone resistente e o susceptível, sendo: 18 de stress-defesa; 7 sinalização; 4 transportadores; e 2 das vias de hormônio. A característica de resistência durável observada na cultivar MDF 180, pode ser consequência da maior quantidade de genes diferentemente expressos encontrados nelas e na maior expressão gênica por parte de genes de defesa, sinalização, transporte e vias de hormônios nesta cultivar.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*; *Microcyclus ulei*; Mal-das-folhas; interação patógeno-hospedeiro; ESTs; macroarranjos.

## ABSTRACT

ANDRADE JÚNIOR, Sizenando José. M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz. May, 2008. **ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES INVOLVED IN INTERACTION *Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei***. Adviser: Dr. Abelmon Gesteira. Co-advisers: Dr. Dominique Garcia and Dr. Julio Cascardo.

The South American Leaf Blight caused by *Microcyclus ulei* is one of the main diseases that affect the *Hevea* plants, and it represents a great threat for the world production of natural latex. The main alternative to fight this disease is related to genetic breeding of rubber tree to obtain durable resistant clones. Previous genetic mapping and QTL detection studies showed that the resistance to *M. ulei* involved, at least, three chromosome regions, and that a better understanding of the genetic bases involved in this interaction is necessary for an effective disease control. An efficient strategy to elucidate the resistance mechanisms consists in the identification of genes differentially expressed between genotypes with contrasting responses to pathogen attack. The production of expressed sequence tags (ESTs) and global transcriptomic analysis are efficient and powerful strategies to identify genes regulated by biotic or abiotic stresses. Moreover, the use of the suppression subtractive hybridization (SSH) increased gene characterization and allowed the generation of sequence information for micro- and macroarrays design and genomic annotation. This allows the analyses of large scale gene interactions. The present work lead with the identification of unigene ESTs for each cultivar; particular attention was given to ESTs with function related to defence responses, cell signalization,

transport and hormone pathways, obtained from 4-28 d.a.i. *Hevea-Microcyclus* SSH libraries. In the resistant cultivar, 31 sequences homologous to defence genes, 7 to genes involved in hormone pathways, 12 related to gene transport and 19 to signalization pathway were identified. In the susceptible cultivar, the number of sequences was lower (4): 2 showing homology with defence genes, 1 with protein transport and 1 involved in signalization apparatus. In this cultivar, no original sequence related to hormone pathways was observed. Afterwards, functional analyses of these sequences via macroarrays were made. Unigene sets of sequences were obtained, submitted to plasmid DNA extraction, polymerase chain reaction for fragment amplification and finally, denatured with NaOH and fixed in Nylon membranes. The cDNA used in the hybridization process were synthesized from rubber tree leaf transcriptomes (from the partially resistant clone, MDF180, and the susceptible one, PB 314) infected with *M. ulei* (10 d.a.i.). These cDNAs were hybridized on the membranes using the AlkPhos kit (GE Healthcare, USA). The results showed a differential expression between resistant and susceptible clones for 31 sequences: 18 from stress-defence functional class; 7 from signalization; 4 from transport; and 2 from hormone pathways. The durable resistance observed in the MDF 180 cultivar may be the consequence of higher amount of genes and higher gene expression of defence, signalization, transport and hormone pathways found in this cultivar.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*; *Microcyclus ulei*; South American Leaf Blight; ESTs; macroarrays.

## 1. INTRODUÇÃO

*Hevea brasiliensis*, popularmente conhecida como seringueira, é originária da bacia hidrográfica do Rio Amazonas e pertence ao gênero *Hevea* que abrange onze espécies, das quais *H. brasiliensis* é a única cultivada comercialmente por ter melhor rendimento e qualidade de látex (GONÇALVES et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005a; GONÇALVES et al., 2005b; GARCIA et al., 1995; OMOKHAFE, 2004). Sua dispersão natural está circunscrita aos limites da região amazônica sendo que essa cultura mostra grande adaptabilidade aos mais variados ambientes que possuam clima tropical úmido (LIBEREI et al., 2007).

As grandes áreas de produção de látex do mundo concentram-se no sudeste asiático, principalmente Tailândia e Indonésia que respondem por 27% e 29% da produção mundial respectivamente. Nesses países a cultura é baseada principalmente em cultivares susceptíveis ao Mal-das-folhas (*South American Leaf Blight* – *SALB*), doença causada pelo ascomiceto *Microcyclus ulei* (CHEE and HOLLIDAY, 1986), que foi primeiramente descrito por Ule em 1900 na região amazônica (ULE, 1905). O Brasil já foi o maior produtor mundial de borracha natural, mas devido à alta ocorrência de surtos do Mal-das-folhas a cultura da seringueira entrou em crise e hoje o país não produz o suficiente para suprir suas necessidades internas, sendo necessária a realização de importações desta matéria-prima (GASPAROTTO et al., 1997; COSTA et al., 2001). Dentre os estados brasileiros que cultivam a seringueira a Bahia é o estado que apresenta a terceira maior produção de látex nacional, produzindo menos apenas que os estados de São Paulo e o Mato Grosso. No sudeste baiano, a seringueira representa uma alternativa para os

cultivos em sistema agroflorestal incluindo banana e cacau, tendo como principal vantagem a diversificação da renda dos pequenos produtores.

No Brasil, um maior desenvolvimento da heveicultura depende, sobretudo do combate ao Mal-das-folhas, que pode envolver diferentes métodos e o melhoramento genético aparece como a solução mais viável em longo prazo. Para desenvolver cultivares com resistência a doença programas de melhoramento genético foram desenvolvidos na América Latina, sendo os principais descritos a seguir: De 1928 até 1945 a *Ford Motor Company* fez plantios industriais com materiais de prospecções, essa iniciativa deixou cultivares que serviram para o programa de melhoramento da *Firestone* de 1947 até 1983. A *Firestone* em colaboração com Instituto Agrônomo do Norte (IAN) desenvolveu o segundo projeto de melhoramento da seringueira e iniciou o processo de intercâmbio de material vegetal entre diferentes regiões do mundo.

Desses dois programas de poucos cultivares foram selecionados e recomendados para plantio em grande escala, provavelmente por causa da baixa produção das plantas resistentes, quando comparadas com os cultivares asiáticos. Um terceiro projeto de melhoramento genético teve início em 1991, em que a partir dos acessos deixados pela *Firestone*, a *Michelin* e o CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement - FR*) iniciaram um programa de melhoramento ao Mal-das-folhas baseados nos avanços dos conhecimentos sobre interações planta-patógeno.

A partir deste projeto foram iniciados trabalhos de mapeamento genético da seringueira pelo CIRAD com o objetivo de obter as primeiras bases genéticas da resistência ao Mal-das-folhas. Porém viu-se que embora valiosas, essas informações não são suficientes para o entendimento da interação, notando-se a necessidade de entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação. Para tanto foi iniciado em 2004 na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) um projeto com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares da interação *Hevea-M.ulei* através de estudos genômicos.

Para identificar genes candidatos relacionados com a resistência ou suscetibilidade de seringueira ao Mal-das-Folhas, foram desenvolvidas quatro bibliotecas de cDNA subtrativas, a partir de folhas da cultivar suscetível PB 314 e da cultivar que apresenta resistência parcial MDF 180 inoculadas com conídios de



*M.ulei* em condições controladas (temperatura, umidade, iluminação). Esta é a primeira fonte de ESTs de folhas de *Hevea* e particularmente de uma interação *Hevea*-patógeno. Como parte desse projeto, esta pesquisa de mestrado teve como objetivo geral:

- Analisar a expressão de genes relacionados à interação planta-patógeno entre *Hevea brasilienses* e *Microcyclus ulei*.

Para tanto buscou-se (objetivos específicos):

- Identificar genes diferencialmente expressos relacionados com as vias de sinalização, hormonal, de transportes e de defesa vegetal. Em folhas infectadas da cultivar resistente e da cultivar suscetível por comparação *in silico* das bibliotecas subtrativas;

- Analisar a expressão gênica diferencial, via macroarranjos de seqüências envolvidas nos mecanismos de sinalização, transporte e defesa da planta na interação *Hevea-Microcyclus ulei*, 10 dias após infecção com o fungo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Evolução das interações planta-patógeno**

As plantas em seu ambiente natural estão sob constantes ataques de fitopatógenos por sua condição de imobilidade e por possuírem elevada quantidade e qualidade de moléculas com alto potencial energético, utilizados para alimentação (LAM, et al., 2001). Estes organismos podem causar mortalidade, rápido declínio de populações ou trocas dramáticas na estrutura e composição de comunidades vegetais (LOPEZ et al., 2004), diante disso a maneira em que as plantas respondem aos constantes ataques é determinante para sua sobrevivência (RICTHER e RONALD, 2000).

A maioria dos ataques de patógenos resulta em resistência da planta sendo a ocorrência de doença a exceção (GU et al., 2005), isso por existir diferentes tipos de defesa vegetal podendo estas serem constitutivas e/ou induzíveis. A primeira linha de defesa é baseada em barreiras físicas e depende de capas epidérmicas densas, cutículas cerosas, parede celular, enzimas antimicrobianas e metabólitos secundários (HOLUB, 2006; RICTHER e RONALD, 2000; WAN et al. 2002). O nível de sucesso dos patógenos em atravessar esta primeira barreira de defesa depende do grau de co-evolução da relação patógeno-hospedeiro e é crucial para seu estabelecimento (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Essas barreiras conferem resistência de amplo espectro em resposta ao ataque inicial de uma grande variedade de patógenos.

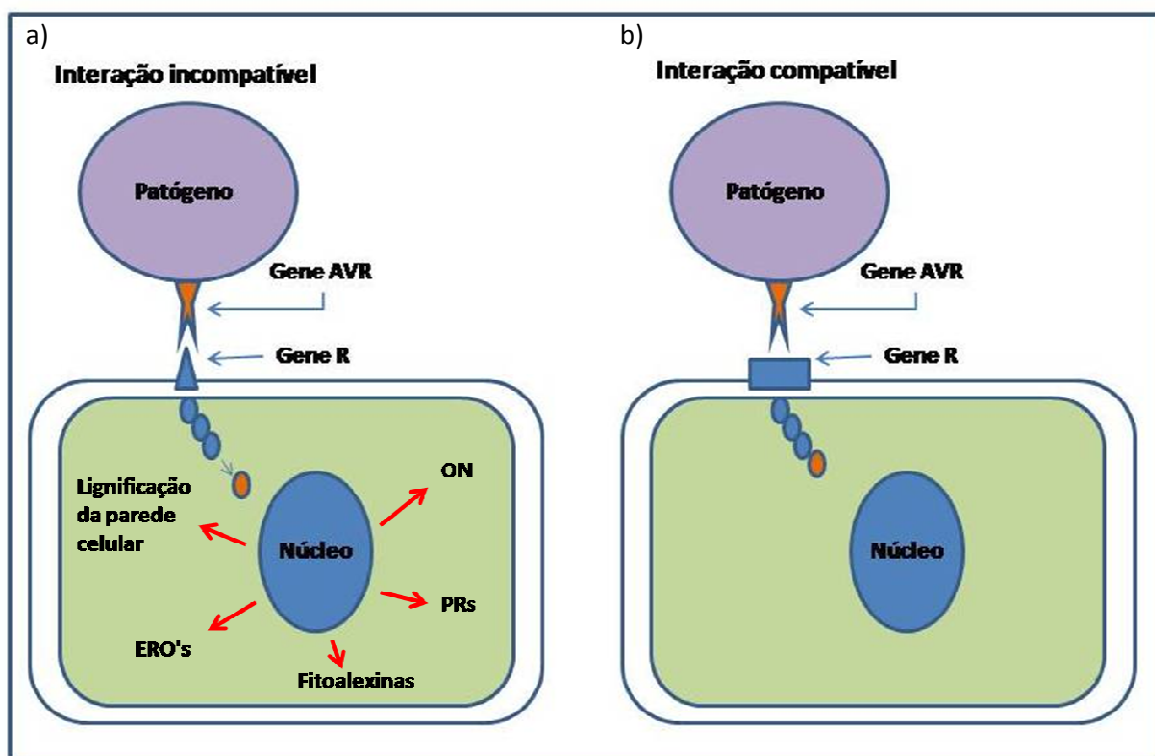
Em caso de suplantação das barreiras pré-formadas, existem mecanismos de defesa induzíveis que geram uma reorganização metabólica visando conter o organismo invasor no local da infecção (HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000; MARTIN et al., 2003; HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003). Os mecanismos de

defesa induzíveis são principalmente baseados na atuação de proteínas codificadas por genes de resistência responsáveis pela rápida e efetiva reorganização metabólica nos processos de defesa, sendo capazes de direta ou indiretamente reconhecer proteínas elicitoras dos patógenos e ativar as respostas ao ataque (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996; MARTIN et al., 2003; HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003, BELKHADIR et al., 2004).

Em nível populacional, ambos, hospedeiro e patógeno estão em constante batalha evolucionária para desenvolver a habilidade para reconhecer e para escapar do reconhecimento e manter a virulência, respectivamente (NIMCHUK et al., 2003). Durante o processo evolutivo uma determinada raça ou linhagem de patógeno pode suprimir a resistência não-hospedeira a partir da aquisição de fatores de virulência os quais possibilitam a invasão e a supressão dos mecanismos de defesa da planta. Quando isso ocorre a planta torna-se hospedeira desse patógeno (ABRAMOVITCH e MARTIN, 2004; CHANG et al., 2004; ESPINOSA e ALFANO, 2004).

As interações entre plantas e patógenos podem ser classificadas como compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível o patógeno invade o tecido vegetal se estabelecendo através de seus mecanismos de patogenicidade que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares ou liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelulares da planta, culminando no desenvolvimento da doença (WAN et al., 2002; WHITE et al., 2000).

Na interação incompatível, o patógeno fica restrito ao sítio de infecção devido ao rápido reconhecimento do patógeno pela planta e o desencadeamento de seus mecanismos defensivos. Análises genéticas desse processo têm levado a aceitação do modelo de interação gene-a-gene, primeiramente proposto por Flor (1971), em que um gene de resistência (R) do hospedeiro interage diretamente com um gene de avirulência (Avr) do patógeno, desencadeando mudanças metabólicas que culminam no processo de defesa denominado resposta de hipersensibilidade (HR) a qual envolve morte celular na região infectada, acúmulo de compostos antimicrobianos e transmissão de sinais para células adjacentes (Figura 1). Baseado na teoria de Flor (1971), a diferença básica entre a interação compatível e a incompatível está relacionada à presença ou funcionalidade do gene de resistência na planta ou do gene de avirulência no patógeno.



**Figura 1.** Modelo de interação gene-a-gene proposto por Flor: a) Interação incompatível, um gene R da planta reconhece um gene AVR do patógeno e desencadeia às respostas de defesa da planta, culminando na resistência ao organismo invasor. b) Interação compatível, o gene R presente na planta não reconhece o gene AVR do patógeno, de maneira que as respostas de defesa vegetais não são ativadas, culminando na ocorrência da doença.

Quando há reconhecimento do patógeno pela planta ocorre uma rápida ativação de vias de transdução de sinais, de forma coordenada e complexa que resulta na alteração de fluxo de íons, geração de espécies reativas de oxigênio, produção de óxido nítrico, fortalecimento da parede celular e morte celular programada das células inicialmente infectadas, como foi observado nas interações entre: *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* e *Lycopersicon lycopersicon* (MARTIN et al., 2003); *Cladosporium fulvum* e *Lycopersicon lycopersicon* (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997); *Pseudomonas syringae* e *Arabidopsis thaliana* (BELKHADIR et al., 2004); *Sphaerotheca fusca* e *Arabidopsis thaliana* (MAOR e SHIRASU, 2005; *Blumeria graminis* e *Arabidopsis thaliana* (LOON et al., 2006).

Devido à ação de moléculas sinalizadoras o mecanismo de defesa também é ativado nas células adjacentes àquelas que sofreram HR estas células ativam genes de defesa que codificam proteínas de parede celular, peroxidases, proteinases, enzimas hidrolíticas, proteínas relacionadas à patogênese (PRs) e enzimas

envolvidas no metabolismo secundário (TAKKEN e JOOSTEN, 2000; BRUCE e PICKETT, 2007).

Esta resposta conhecida como resistência sistêmica adquirida (*Sistemic acquired resistance* - SAR) confere resistência de amplo espectro efetiva contra um grande número de patógenos (HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003). A nível molecular a SAR é caracterizada pelo aumento da expressão de um grande número de genes relacionados a patogênese tanto na região da infecção ou em tecidos adjacentes (DURRANT e DONG, 2004; VAN LOON e VAN STRIEN, 1999). Ela gera um reforço no sistema de defesa de toda a planta, sendo que em alguns casos plantas infectadas nas folhas por um determinado patógeno passa a resistir a infecção nas raízes por patógenos completamente diferentes (BEZEMER et al., 2003), e organismos não patogênicos no rizósforo tem sido eficientes em elicitar os sistemas de resistência induzida aumentando a defesa contra patógenos foliares (VAN DAM et al., 2005).

O mecanismo de defesa baseado em resposta de hipersensibilidade ainda não foi bem estabelecido na interação *Hevea brasiliensis* e *Microcyclus ulei*, porém indícios observados no estudo desse patossistema tais como quebra da resistência de da seringueira ao mal-das-folhas por distintas raças do fungo, ou observações dos padrões de segregação das características de resistência e suscetibilidade, tem levado aos pesquisadores a acreditar na existência de um padrão de resistência semelhante ao proposto por Flor (1971), e o avanço das pesquisas moleculares dessa interação poderão confirmar ou anular essa hipótese.

## **2.2. Sintomatologia do Mal-das-folhas.**

O Mal-das-folhas é causado pelo ascomiceto *Microcyclus ulei* que infecta folíolos jovens de 7 a 10 dias após brotamento, induzindo sintomas que dependem principalmente da suscetibilidade clonal (GASPAROTTO et al., 1997), este fungo não consegue infectar folhas maduras.

Na infecção das folhas jovens de seringueira observa-se um curto período, de 4 a 6 dias, com ausência de sintomas da doença (período de latência). As lesões têm sempre um tamanho limitado entre 0,5 até 5mm e podem ser confluentes. Não são observadas reações necróticas sistêmicas. Cinco etapas distintas são descritas

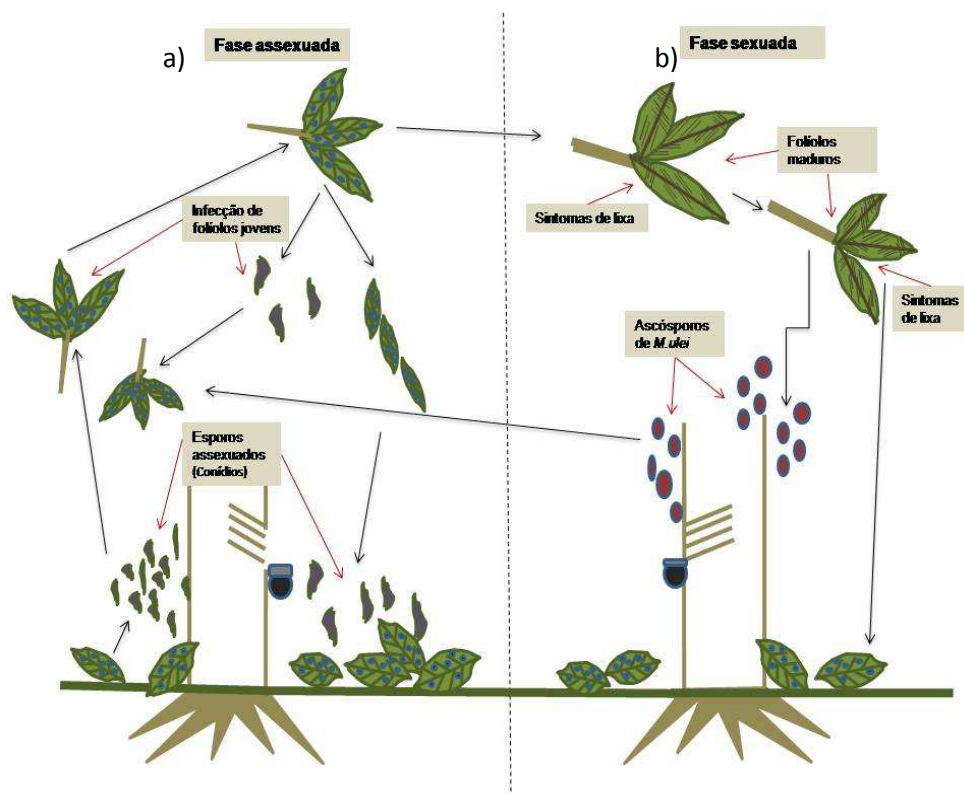
no ciclo infecciosos de *M. ulei* (HOLLIDAY, 1970; GARCIA et al., 1999, SAMBUGARO et al. 2003). A germinação dos conídios e a penetração das folhas ocorrem nas 24 primeiras horas após a inoculação de forma similar nos cultivares susceptíveis e resistentes (GARCIA, 1999). As hifas se propagam rapidamente de forma intercelular através dos parênquimas e 3 dias após a infecção (dai) as hifas se diferenciam na face inferior da folha em conidióforos (LIEBEREI, 2007). A esporulação abundante do fungo ocorre entre 8 e 14 dai. Folhas altamente infectadas caem e são rapidamente degradadas, enquanto folhas com um nível médio de infecção permanecem na árvore e permitem o desenvolvimento na face superior das estruturas estromáticas (telemorfa) com ascósporos.

Em folíolos infectados de clones suscetíveis, observam-se lesões levemente escurecidas que provocam deformações e enrugamentos nos limbos, especialmente nas superfícies abaxiais. Essas lesões logo apresentam tonalidades de aspecto cinza-esverdeado-feltroso resultantes da esporulação conídial da primeira fase assexuada de *M. ulei*. Normalmente, esses folíolos caem rapidamente quando os ataques ocorrem de forma mais severa (HOLLIDAY, 1970). Infecções e reinfecções do patógeno podem causar desfolhamentos sucessivos, ocasionando o secamento dos terminais de hastes e de galhos e, conseqüentemente, morte descendente da planta. Nessas condições, lesões do patógeno podem ser observadas em pecíolos, ramos e até em frutos jovens.

Em folíolos caídos após dois meses de infecção, ocorre a total formação de estromas (sintomas de lixa), em mais um mês ocorre a formação de ascos, seguida pela liberação de ascósporos. Dessa forma, a duração total do ciclo de vida do patógeno compreende um período de quatro a cinco meses (JUNQUEIRA et al., 1988; JUNQUEIRA et al., 1990). A presença da fase sexuada aumenta a possibilidade de combinação gênica, além de mutações ocasionais, esse fato pode explicar a alta variabilidade de raças (ou grupos fisiológicos) observada nesse patógeno, em todas as regiões onde se cultiva seringueira (HOLLIDAY, 1970; JUNQUEIRA et al., 1988; MATTOS et al., 2003).

O fungo *M. ulei* apresenta, em seu ciclo de vida, dois tipos de esporos infectivos, conforme o tipo de reprodução (Figura 2): conidiósporos (reprodução assexuada), cujo ciclo de vida varia de 6 a 10 dias, conforme a variedade; e ascósporo (reprodução sexuada), com ciclo de vida de 100 a 150 dias enquanto

permanece nos ascos, pois quando liberados perdem a capacidade de germinação tão rápido quanto os conidiósporos (CHEE e HOLIDAY, 1986; FURTADO, 2007). Este patógeno é de difícil controle por sua rápida disseminação, alta capacidade de causar danos e seu difícil controle (GASPAROTTO, 1997).



**Figura 2.** Ciclo de vida do *Microcyclus ulei*. a) Primeira fase do ciclo de vida do fungo, fase assexuada caracterizada pela grande formação e liberação de conídios. b) Segunda fase do ciclo de vida, fase sexuada, caracterizada pela formação de estromas, aparecimento de ascos e liberação de ascósporos (adaptado de GASPAROTTO, 1997).

### 2.3. Resistência genética de *Hevea brasiliensis* ao *Microcyclus ulei*

Os primeiros estudos sobre os componentes de resistência da seringueira ao *M.ulei*, realizados sob condições controladas e em plantas intactas, foram feitos por Junqueira e colaboradores (1985), que constataram que o período de latência do patógeno, o diâmetro das lesões e a esporulação dos tecidos infectados são os mais importantes parâmetros para avaliar a resistência da seringueira a *M.ulei*. Este mesmo autor também constatou que, o período de incubação do fungo e o número de lesões não são bons parâmetros para análise dessa resistência.

De acordo com as características acima mencionadas Junqueira e colaboradores (1988), atribuíram um sistema de notas relacionadas aos tipos de reações de clones de seringueira infectadas com *M.ulei*. Posteriormente esse sistema de notas foi readaptado por Mattos e colaboradores (2003), o que simplificou a análise e a identificação do tipo de reação de resistência dos clones de seringueira (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sistema de notas relacionadas aos tipos de reações de clones de seringueira infectadas com *M.ulei*. Estabelecido por Junqueira et al. (1988) e readaptado por Mattos et al. (2003).

	Nota - Junqueira et al (1988)	Nota - Mattos et al (2003)	Classificação da reação -Junqueira et al (1988)
Pontos cloróticos < 1 mm de diâmetro	0	1	Altamente resistentes
Pontos necróticos < 1 mm de diâmetro	1	1	
Lesões com centro necrótico – 1 a 2 mm de diâmetro – Sem esporos	2	1	Resistente
Lesões com diâmetro > 2 mm – Sem esporos	3	2	
Lesões com até 1.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar	4	3	Resistência moderada
Lesões com diâmetro < 3 mm – com 1.000 a 30.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar	5	3	
Lesões com diâmetro > 3 mm parcialmente esporuladas ou lesões com 1 a 2 mm de diâmetro com forte esporulação na face abaxial (30.000 a 70.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar)	6	4	Suscetível
Lesões com diâmetro de 2 a 2,5 mm, com forte esporulação na face adaxial (70.000 a 400.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar)	7	6	
Lesões com diâmetro de 2 a 2,5 mm, com esporos na face adaxial e com forte esporulação na face abaxial (mais que 400.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar)	8	6	Altamente suscetível
Lesões com diâmetro > 2,5 mm, com abundante esporulação na face abaxial (mais que 400.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar)	9	5	
Lesões com diâmetro > 2,5 mm, com esporulação na face abaxial e abundante esporulação na face adaxial (mais que 400.000 conídios/cm <sup>2</sup> por superfície foliar)	10	6	

A partir de observações dos tipos de reações dos clones de seringueira sob condições controladas de inoculação ou sob infestação natural do *M.ulei*, é definida o tipo de resistência desse clone e este pode ou não ser selecionado para programas de melhoramento genético da seringueira.



Um clone promissor no que diz respeito a busca da resistência durável ao mal-das-folhas é o MDF 180 clone primário de *H.brasiliensis* que foi identificado no programa de melhoramento genético realizado pela Plantações Michelin da Bahia, juntamente com o CIRAD. Foi observado por Le Guen e colaboradores (2008), a partir de estudos de campo e sob condições controladas, a reação de variedades de cultivares de seringueira quando infectadas por diferentes raças do *M.ulei* e pôde-se constatar que MDF 180 apresenta resistência parcial ao fungo caracterizada pela elevada formação de conídios, mas ausência de lesão estromática o que impede a queda dos folíolos infectados e a conseqüente morte da planta.

Estes resultados estão de acordo com os de Sambugaro e colaboradores (2004), que desenvolveram uma pesquisa com intuito de caracterizar os aspectos anatômicos foliares envolvidos com a patogênese do *M.ulei* em três clones de seringueira (MDF 180, PB314 e FX2784). E pôde-se observar nesse estudo que a cultivar de seringueira PB 314 apresenta alta suscetibilidade ao fungo, evidenciada pela alta esporulação, destruição dos tecidos vegetais e estabelecimento da segunda fase do ciclo de vida do fungo. Na cultivar MDF 180 é observada resistência parcial ao fungo com formação de conidiósporos e liberação dos conídios, porém sem destruição do tecido vegetal. Esses autores observaram que nesta cultivar a segunda fase do ciclo de vida do fungo não ocorre, não havendo formação de lesão estromática. Em seu lugar é observada a deposição de compostos fenólicos nos tecidos vegetais afetados, o que leva os autores a sugerirem que estes compostos teriam importantes papéis na contenção da doença nesta cultivar.

Até o momento, poucas foram as pesquisas realizadas visando descrever as bases genéticas e o entendimento das interações moleculares envolvidas no processo de resistência ao Mal-das-folhas, sendo a maioria das pesquisas com *Hevea* voltadas para o entendimento e melhoramento do processo de produção de látex.

No intuito de mapear genes de resistência de seringueira foi realizada a identificação de *Quantitative trait locus* (QTLs) de resistência ao *M. ulei* em *Hevea brasilienses*. Este estudo foi realizado na descendência de PB260 x RO38 infectadas com *M.ulei* em condições controladas que permitiram identificar 8 QTLs de resistência. Acredita-se que um deles que é comum a todas as cepas e fica

localizado no grupo de ligação g13, possa ser responsável por até 30% da variabilidade fenotípica (LESPINASSE et al., 2000). Na mesma descendência, avaliada para a resistência no campo, a determinação da resistência parece ser monogênico (LE GUEN et al., 2003).

Para verificar a estabilidade destes QTLs, 3 cepas proporcionando níveis de resistência completa, parcial e baixa sobre RO38 foram testadas em condições controladas na descendência PB260 x RO38. Resultados com essas cepas mostram que no genótipo RO38 a resistência parcial pode corresponder a presença de um QTL de maior efeito ou ao acúmulo de vários QTLs com efeito variável. Esse trabalho sugere que cepas isoladas podem quebrar a maioria ou a totalidade da resistência baseada nos QTLs identificados (LE GUEN et al., 2007).

Esses resultados confirmam a complexidade do determinismo da resistência a *M. ulei* em seringueira, de maneira que a implementação de novas tecnologias como ferramentas de estudos genômicas poderiam auxiliar no entendimento das bases genéticas da interação *Hevea brasiliensis* x *Microcyclus ulei*.

## **2.4. Genômica nas interações planta-patógeno.**

A análise da expressão gênica em larga escala durante uma interação patógeno-hospedeiro permite uma visão aprofundada dos eventos moleculares que ocorrem no processo de estabelecimento da doença (BIRCH e KAMOUN, 2000; KAZAN et al., 2001). A partir daí novos genes podem ser identificados oriundos de seqüenciamentos de bibliotecas de interações patógeno-hospedeiro possibilitando o desenvolvimento de testes rápidos para a avaliação precoce de genótipos, abrindo novas estratégias para o melhoramento tradicional, engenharia genética, além da aplicação da resistência induzida (KRUGER et al., 2002; GUILLEROUX e OUSBORN, 2004; STASKAWICZ et al., 1995).

Foram criadas uma série de tecnologias para auxiliar no entendimento dos mecanismos de interação gênica em diferentes condições e apesar de serem bem definidos, sensíveis e robustos, os métodos tradicionais de análise de expressão gênica, como *Northen blot*, Hibridizacao *in situ*, PCR (*Polymerase chain reaction*), ou RT-PCR (*Reverse polymerase chain reaction*), são adequados para análise de um

número pequeno de genes, sendo necessária a implementação de técnicas capazes de analisar maiores quantidades de informações possíveis.

Atualmente, existem diferentes metodologias que permitem uma análise global do transcrito, entre as mais utilizadas estão: a geração e seqüenciamento de *Expressed sequences tags (ESTs)* (ADAMS et al, 1991); *Differential display (DD)* (LIANG e PARDEE, 1992); *Serial analysis of gene expression (SAGE)* (VELCULESCU et al., 1995); *Amplified restriction fragment polymorphism* baseado em cDNA (cDNA-AFLP) (VOS, et al 1995); *Suppression subtractive hybridization (SSH)* (DIATCHENKO et al 1996) e os *arrays de DNA* (SCHENA et al., 1995).

Devido a existência de grandes regiões não codificadoras no DNA, tem-se utilizado como alternativa, seqüenciar apenas as regiões codificadoras dando origem a bancos de etiquetas de seqüências expressas (ESTs). A base do método consiste no fato de que o nível de mRNA tecido-específico presente em uma espécie é refletido pela freqüência de ocorrência de seu EST correspondente em uma biblioteca de cDNA (ADAMS et al., 1991). O aprimoramento desta tecnologia e sua disponibilização em banco de dados, associado ao completo seqüenciamento de genomas emergem como métodos promissores para identificação de genes relacionados com diferentes processos em plantas (SCHUEIDELER et al., 2002).

Quando se quer identificar e comparar genes expressos em condições distintas, a criação de bibliotecas subtrativas tem obtido destaque visto que é uma técnica que permite comparar duas populações de mRNA e obter clones de transcritos que são expressos em uma população e não em outra (DIATCHENKO et al., 1996). Essa técnica tem sido eficiente em detectar genes diferencialmente expressos em interações planta-patógeno e se baseia na subtração de populações de transcritos oriundos de tecidos submetidos a condições biológicas distintas de forma a enriquecer bibliotecas para os genes diferencialmente expressos em termos qualitativos (DIATCHENKO et al., 1996; FERNANDEZ et al., 2004; LEAL JUNIOR et al., 2007). Também nos possibilita isolar e seqüenciar transcritos obtendo a partir do confronto destas informações com bancos de dados suas possíveis funções.

As bibliotecas subtrativas são pouco informativas no que diz respeito à intensidade de expressão de um transcrito e da dinâmica da resposta da planta em relação ao ataque do patógeno, de maneira que metodologias inovadoras, como arranjos de DNA (*DNA arrays*), foram desenvolvidas para explorar dados gerados a

partir das seqüências de DNA e produzir informações sobre os níveis dinâmicos de expressão gênica de genomas inteiros. A técnica de microarranjo permite o monitoramento dos níveis de expressão de milhões de genes simultaneamente em diferentes tipos de células ou em condições fisiológicas distintas (EVANS et al., 2004; KAZAN et al., 2001). Os arranjos de DNA são constituídos por suportes sólidos, comumente vidro ou náilon, aos quais são fixadas de forma ordenada seqüências completas ou parciais de genes em fita simples de DNA, com ou sem função conhecida (DUGGAN et al., 1999). Macroarranjos confeccionados em membranas de náilon, tem o custo de implementação significativamente inferior aos microarranjos além de serem de fácil implementação na maioria dos laboratórios de biologia molecular, sem a necessidade de grandes investimentos e longos períodos de padronização (BALDWIN et al., 1999; KUHN, 2001).

A partir do mRNA das células em estudo é obtido o DNA complementar (cDNA) que após serem marcados (por radioatividade ou fluorescência) são utilizadas como sondas e encaminhados para hibridação com os arranjos. Nesse processo quanto maior a expressão de um gene em uma determinada condição, maior será a intensidade do sinal derivado da sonda hibridada na região do arranjo que contém a seqüência deste gene (FELIX, 2002). A análise dos padrões diferenciais de expressão gênica é realizada através do cálculo da razão entre os valores dos sinais das distintas hibridações, que refletem a diferença na quantidade dos transcritos (BALDWIN et al., 1999; MOODY et al., 2000).

Os macroarranjos vêm sendo amplamente utilizados no estudo de perfis de expressão gênica e larga escala. Schena e colaboradores (1995) descreveram pela primeira vez a grande capacidade analítica da técnica, monitorando 45 genes de *Arabidopsis* simultaneamente. Desde então, a aplicação da tecnologia de arranjos de DNA vem sendo relatada em vários organismos tais como plantas (SCHENA, 1995; FELIX, 2002), leveduras (De RISI et al., 1997) e animais inclusive seres humanos (MOODY et al., 2002; EVANS et al., 2004).

A utilização da técnica de macroarranjos para identificar a expressão diferencial de genes envolvidos na interação *Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei*, a partir de seqüências oriundas de bibliotecas subtrativas de ESTs, pode fornecer valiosas informações que possibilitariam um melhor entendimento dos processos

moleculares envolvidos nessa interação a serem utilizadas em programas de melhoramento genético da seringueira.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Identificação de genes relacionados a sinalização e defesa

No projeto “Estudo molecular da interação entre *Hevea brasiliensis* e o *Microcyclus ulei*” iniciado em 2004 na Universidade Estadual de Santa Cruz em parceria com o CIRAD e a *Michelin*, foram construídas quatro bibliotecas subtrativas a partir de duas cultivares contrastantes de seringueira, PB 314 suscetível ao *M.ulei* e MDF 180 que apresenta resistência parcial a uma grande quantidade de raças do fungo. Duas bibliotecas subtrativas foram construídas a partir de *pools* de RNAs extraídos de folhas 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a infecção (hai.) vs. RNAs de folhas saudáveis obtidas no mesmo período de tempo. As duas outras bibliotecas SSH foram criadas a partir de *pools* de RNAs de folhas coletadas 4, 10, 16, 22 e 28 dias vs. folhas saudáveis obtidas no mesmo período de tempo.

Nestas bibliotecas foram identificadas 1.819 seqüências únicas (Tabela 2), representando os possíveis genes super-expressos nas cultivares suscetível e parcialmente resistente. A anotação das seqüências obtidas foi realizada por BLAST X e TBLAST X confrontando-as com bancos de seqüências GenBank NR, GO e PFAM. Para as seqüências relacionadas com as vias de sinalização, transportes, hormônios e proteínas de estresse e defesa, foram comparadas entre as bibliotecas SSH das cultivares MDF 180 e PB 314 infectadas entre 4-28 dias.

**Tabela 2.** Número de seqüências obtidas nas bibliotecas SSH da interação *Hevea-M.ulei*.

Bibliotecas	Singletons (%)	Contigs <sup>3</sup>	Seqüências únicas (%) <sup>4</sup>
MDF180 – 6 a 72 h.a.i. <sup>1</sup>	206 (19)	146	352 (33)
PB314 – 6 t a 72 h.a.i	626 (58)	125	751 (70)
MDF180 – 4 a 28 d.a.i. <sup>2</sup>	508 (63)	111	619 (77)
PB314 – 4 a 28 d.a.i	39 (5)	58	97 (14)
Total	1379	440	1819

<sup>1</sup> h.p.i = Horas após a infecção

<sup>2</sup> d.a i. = Dias após a infecção

<sup>3</sup> Contigs presentes em cada biblioteca independente das outras.

<sup>4</sup> O set unigen é composto pela soma dos singletons com os contigs para cada biblioteca.

## 3.2. Análise da expressão gênica via macroarranjos

### 3.2.1. Confeção dos macroarranjos

#### 3.2.1.1. Escolha dos fragmentos de interesse

Entre as seqüências únicas identificadas nas bibliotecas subtrativas foram selecionadas 353 ESTs das variedades susceptível e resistente de *H. brasiliensis* relacionadas com as vias de sinalização, hormônios, transporte e defesa. As bactérias recombinantes correspondentes foram manualmente separados em capela de fluxo laminar e inoculados em microplacas de 96 poços contendo 1,2 mL de meio LB. Foram crescidos em incubadora/agitadora a 37°C e 260 rpm, *overnight*.

#### 3.2.1.2. Extração de DNA plasmidial

As colônias crescidas em placas de inóculo foram centrifugadas a 4.000 rpm, 20°C por 10 minutos. O sobrenadante (SN) foi descartado, e as placas foram colocadas para secar invertidas sobre papel absorvente por aproximadamente 2 minutos. Adicionou-se 200 µL de solução PI (EDTA pH 8,0 10 mM; Tris-HCl pH 7,4 26 mM e 0,92% de glicose). Em seguida, as placas foram seladas e agitadas por 2 minutos em vórtex na velocidade máxima, centrifugando-as em seguida a 4.000 rpm,

20°C, por 10 minutos. Novamente dispensou-se o SN e as placas foram colocadas para secar novamente invertidas sobre papel absorvente. Colocou-se 60 µL da solução PI, selou-se e agitou-se por 2 minutos em vórtex na velocidade máxima. Transferiu-se 60 µL da placa de inóculo para placas de fundo U com 3 µL de RNase (10 mg/ml) e acrescentou-se 60 µL da solução PII (NaOH 0,5 M e SDS 1%). Misturou-se por inversão 40 vezes. Deixou-se 5 minutos descansando. Acrescentou-se 60 µL da solução PIII (acetato de potássio 3 M pH 5,2 e ácido acético glacial 11,5%), misturou-se invertendo 40 vezes e deixou-se 30 minutos em estufa a 90°C seguidos de 10 minutos em gelo. Centrifugou-se a 4.000 rpm, 20°C, 10 minutos e transferiu-se 70 µL do SN para uma microplaca de fundo V. Adicionou-se 70 µL de isopropanol e centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 rpm e lavou-se o *pellet* com 200 µL de etanol 70% por três vezes. Descartou-se todo o SN, secando sobre papel absorvente e deixou-se secar as placas em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensionado em 60 µL de água Milli-Q. As amostras foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### **3.2.1.3. Amplificação dos fragmentos selecionados**

Os DNAs plasmídiais foram diluídos na proporção de 1:100 com água Milli-Q. Para cada reação de PCR de 50 µL utilizou-se: 6 µL da diluição, 1X de tampão para PCR, 0,4 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de *primers* SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG - 3') e T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC - 3'), 2 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas). A reação foi realizada no termociclador AmpPCR 9700 (Applied biosystems) utilizando para amplificação a temperatura inicial de 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 54°C para anelamento dos *primers* por 40 segundos e 72°C para extensão dos fragmentos por 1 minuto e 20 segundos. Após os ciclos, as reações permaneceram a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

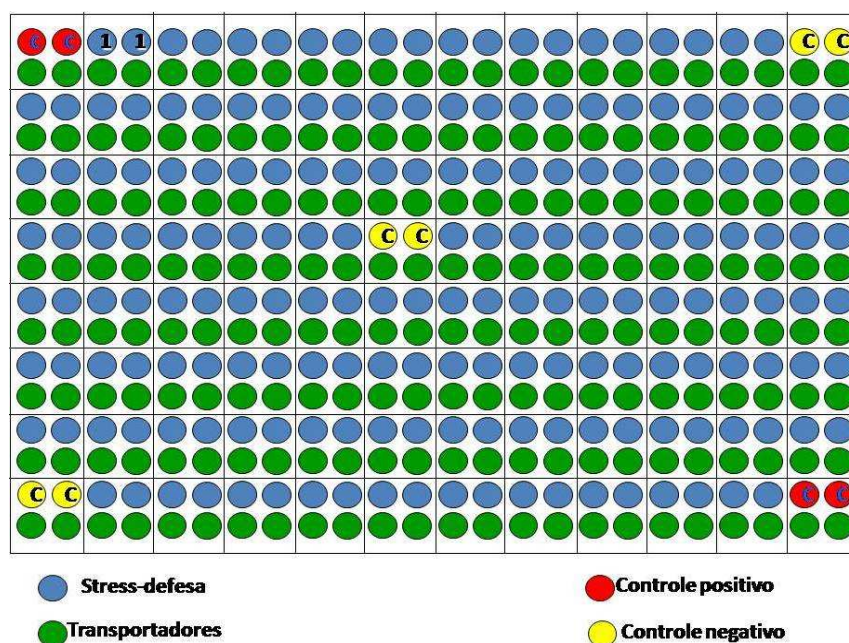
#### **3.2.1.4. Preparo das membranas para os macroarranjos**

Os produtos PCR das seqüências a serem analisadas, foram fixadas em membranas de náilon Hybond N+ (Amershan Biosciences), da seguinte forma: 15 µL do DNA foi desnaturado usando 5 µL de NaOH 0,8 M (ficando a concentração final



de NaOH na solução 0,2 M); foi feita leve agitação por 2 minutos e em seguida incubou-se a 37°C em estufa de incubação por 15 minutos; enquanto isso lavou-se e flambou-se o replicador com isopropanol (procedimento repetido a cada mudança de amostra); foi transferido para recortes da membrana de 8,0 x 12,5 cm, com o replicador aproximadamente 7 µL da solução contendo DNA-0,2M de NaOH, ao término das transferências secou-se as membranas com auxílio do secador; realizou-se então a fixação da solução na membrana utilizando o *optimal Cross-linker* (Spectro Linker, Spectronics Corporation) por duas vezes. Então as membranas foram armazenadas a temperatura ambiente.

A organização das seqüências nas membranas obedeceu aos seguintes critérios: Na membrana 1 foram colocadas as seqüências referentes a estresse e proteínas de defesa e transportadores (Figura 3); na membrana 2 foram fixadas seqüências referentes a estresse e proteínas de defesa (as que não couberam na membrana 1), as vias de sinalização e hormônios. Cada seqüência foi fixada em duplicata, e foi utilizado como controle positivo o gene ribossomal 18S e como controle negativo DNA genômico do fago lambda.



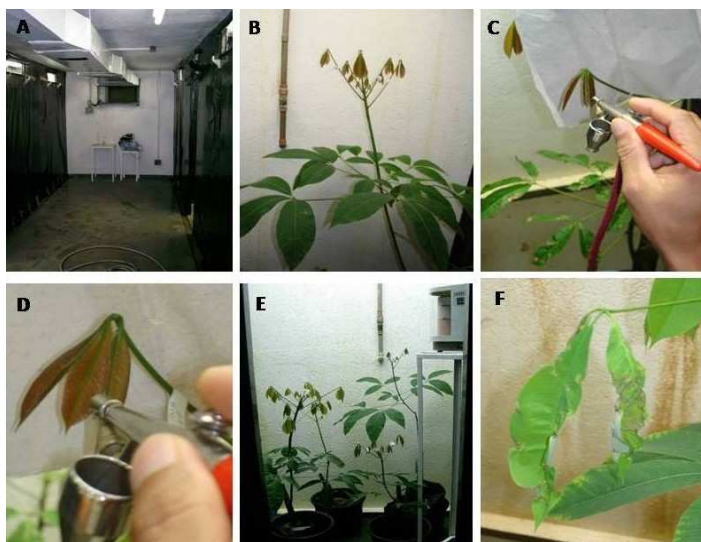
**Figura 3.** Organização das seqüências na membrana1. Como controle positivo foi utilizado o produto de PCR do gene do 18s e como controle negativo foram utilizados fragmentos do fago Lambda (100 ng/uL) nas extremidades e o plasmídeo não transformado, utilizado na construção das bibliotecas subtrativas.

### 3.2.2. Obtenção e marcação de cDNAs alvos para hibridação

Para obtenção e marcação do material vegetal a ser hibridado com as sondas fixadas nas membranas de náilon, foi realizado os seguintes procedimentos: Inoculação de *M. ulei* em folíolos jovens de seringueira; Extração de RNA total; Tratamento com DNase I; Síntese de cDNA; e Marcação dos cDNAs alvos (Fixação da fosfatase alcalina);

#### 3.2.2.1. Inoculação de *M. ulei* em folíolos jovens de seringueira

Plantas de seringueira das cultivares MDF 180 e PB 314 crescidas em casa telada nas Plantações Michelin da Bahia (Ituberá, BA), que possuíam lançamentos foliares no estágio B<sub>2</sub> (HARLLÉ et al., 1978) foram selecionados e inoculados com uma suspensão de  $2 \times 10^5$  conídios/ml do isolado FTP 28 do fungo *M. ulei* acrescentada de Tween 80 - 0,05% (Figura 4). As faces inferiores dos folíolos jovens foram inoculadas e as plantas mantidas em câmara úmida a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , com umidade relativa de 95%, foram mantidas 24 horas no escuro, seguido por 10 dias com fotoperíodo de 12 horas. Para as plantas testemunhas a face inferior das folhas (estágio B<sub>2</sub>), foi pulverizada com água.



**Figura 4.** Inoculação de conídios de *M. ulei* em folíolos jovens de seringueira: a) Câmara úmida onde foram realizadas as inoculações; b) Seleção de plantas dos cultivares MDF 180 e PB 314, que apresentavam folíolos jovens (estágio B<sub>2</sub>); c) Seleção dos folíolos a serem inoculados e separação de outros folíolos a serem usados como testemunhas (inoculados apenas com água); d) Inoculação da face inferior dos folíolos; e) Etiquetagem e início da incubação com fotoperíodos; f) Folíolo de MDF 180 10 dias após inoculação.

#### **3.2.2.2. Extração de RNA total**

De 50 a 100 mg do material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado com 500 µL do tampão de extração *Concert Plant RNA reagent (Invitrogen)*. Posteriormente, foi feita agitação com uso do vórtex até a completa homogeneização do material vegetal, que foi em seguida mantido por 5 minutos no gelo. Ao término do tempo de incubação a amostra foi centrifugada a 13.500 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e 300 µL de clorofórmio, agitando-os por inversão por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.500 rpm por 10 minutos e o topo da fase aquosa foi transferido para um novo microtubo, neste foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado, foi feita leve agitação e incubados no gelo por 10 minutos, após isso centrifugou-se as amostras a 13.500 rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1.000 µL de álcool etílico 70%, agitou-se levemente e foi feita centrifugação a 13.500 rpm por 5 minutos. Em seguida o álcool é totalmente retirado e adiciona-se 50 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### **3.2.2.3. Tratamento com DNase I**

As amostras de RNA total extraídos (45 µL) foram tratados com 1U de desoxirribonuclease I (Fermentas). A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 2 µL de EDTA (10mM, pH 8,0) e incubou-se a 65°C por 10 minutos, para inativação da DNase.

#### **3.2.2.4. Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA complementar (fita simples), foi realizada utilizando de 100 ng a 5 µg de RNA total, 0,5 µg de oligo(dT) e 11 µL de H<sub>2</sub>O DEPC, mantidos a 70 °C por 5 minutos e em seguida colocadas no gelo. Para a reação de transcrição reversa foi adicionado: 4 µL de 5X de *reaction buffer*, 2 µL de mix dNTPs a 10mM; 20U de inibidor de ribonuclease; e 2 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Esse mix foi incubado a 37 °C por 5 minutos e foi adicionado 200U de *RevertAid Minus M-MuLV reverse transcriptase* e foi incubado por 60 minutos a 42 °C. Posteriormente a reação foi aquecida a 72 °C por 10 minutos e colocada em seguida no gelo.

#### **3.2.2.5. Marcação dos cDNAs alvos (Fixação da fosfatase alcalina)**

Os cDNAs alvos foram marcados utilizando o kit AlkPhos Direct™ Labelling (GE Healthcare). A concentração determinada para os procedimentos de hibridação foi 200 ng/μL. Foram testadas concentrações inferiores de cDNA para a hibridação, porém essas mostraram-se insuficientes para o procedimento. Para marcação do cDNA denaturou-se 20 μL do cDNA a ser usado como sonda, por 5 minutos a 99°C em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) seguido por incubação no gelo por 5 minutos. Para cada reação de marcação foi adicionado 10 μL de *reaction buffer*, 2 μL de *labelling reagent* e 10 μL de solução *cross-linker*. A reação foi mantida à 37°C por 30 minutos.

#### **3.2.3. Hibridação dos macroarranjos**

##### **3.2.3.1 Pré-hibridação e hibridação das membranas de macroarranjo**

As pré-hibridações, hibridações e lavagens das membranas foram realizadas de acordo com o protocolo proposto pelo kit AlkPhos Direct™ Detection System (GE Healthcare). As membranas de macroarranjos foram inicialmente tratadas com uma solução fervente de SDS 0,1% para diminuir o possível *background* pré-existente.

As pré-hibridações foram realizadas em garrafas de vidro a 55°C por 40 min, utilizando 12 mL por membrana de solução AlkPhos Direct™ *hybridization buffer* contendo NaCl 0,5 M e 4% de reagente de bloqueio. A hibridação foi realizada adicionando o cDNA alvo marcado na mesma solução utilizada na pré-hibridação. As membranas de macroarranjo foram hibridadas por um período de 16 horas, a 55°C, em forno de hibridação digital (*Fischer Scientific*). Após esse período, as membranas foram lavadas.

##### **3.2.3.2. Lavagem das membranas**

Após a hibridação, procedeu-se à lavagem das membranas para a retirada do excesso de cDNA alvo e das hibridações inespecíficas que possivelmente tenham ocorrido. As membranas foram lavadas duas vezes, por períodos de 20 minutos, a 55°C com 100 mL de tampão de lavagem primário (2 M

de uréia, 0,1% de SDS, 50 mM de fosfato de sódio pH 7,0, 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2% de reagente de bloqueio). Em seguida, foram feitas duas lavagens de 10 minutos cada, a temperatura ambiente com 100 mL de tampão secundário (50 mM de Tris base, 100 mM de NaCl e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>). Em seguida, as membranas foram incubadas com CDP-STAR™ *detection reagent* (com cerca de 40 µL/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada do excesso do reagente de detecção as membranas foram seladas em sacos plásticos para exposição em Hypercassette™ (Amersham), contendo uma folha de filme de autoradiografia Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) por um período de 1 hora e 30 minutos. A revelação do filme procedeu-se imergindo-o por 1 minuto, sob agitação, em solução reveladora, seguida de imersão em H<sub>2</sub>O por 30 segundos, imersão em solução fixadora por 1 minuto sob agitação, e depois os filmes foram lavados em água corrente e expostos ao ar para secagem. As imagens foram digitalizadas através do ImageScanner (Amersham). A qualidade tridimensional dos *spots* foram verificadas utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

### **3.2.3.3. Recuperação das membranas após a hibridação**

As membranas hibridizadas tiveram os cDNAs alvo removidos por duas lavagens de 15 min, com solução pré-aquecida a 65°C contendo 0,4 N de NaOH e 0,1% de SDS. Em seguida procedeu-se nova lavagem por duas vezes, a temperatura ambiente, com solução contendo 0,1% de SDS, 0,1% de SSC e 0,2 M de Tris-HCl pH 8,0.

Após a recuperação das membranas, elas foram novamente lavadas com o CDP-STAR™ *detection reagent* (com cerca de 40 µL/cm<sup>2</sup>), seladas em sacos plásticos e expostas em Hypercassette™ (Amersham), contendo uma folha de filme de autoradiografia Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) por um período de 1 h 30 min. Verificando a ausência de sinal e comprovando a dehibridação completa da membrana

### **3.2.4. Análise estatística das hibridações dos macroarranjos**

A quantificação da intensidade do sinal representando o cDNA alvo hibridado foi feito utilizando o programa BZScan (LOPEZ et al., 2004) que utiliza algoritmos próprios para quantificação de imagens de arranjos em membranas de náilon. Cada *spot* foi determinado pelo posicionamento de um *grid* automático com ajustes

manuais sobre a imagem do arranjo. O valor da intensidade foi determinado pelo algoritmo *Quant Fit Calculated* que já: i) determina a subtração do *background* local sobre a intensidade de cada *spot*; ii) determina qualitativamente os *spots* não confiáveis (qualidade métrica). Os dados obtidos foram transferidos para a Microsoft Excel 2007 para a conversão dos dados em base logarítmica, normalização e análise estatística. Os gráficos foram construídos utilizando os softwares *GraphPad Prism* 3.0 e Microsoft Excel 2007.

Os dados foram normalizados utilizando o método de normalização global baseado na subtração de um fator *c*, que é computado separadamente utilizando a média de cada ponto analisado em comparação à média do controle como descrito por YANG et al. (2002), estabelecendo comparação entre a cultivar resistente e a suscetível. Os dados normalizados foram visualizados em gráficos MA plot. Os gráficos MA representam a mudança na taxa de expressão  $[M = \log_2(\text{inoculado} \div \text{controle})]$  dependentes da intensidade  $[A = \log_2 \sqrt{(\text{inoculado} \times \text{controle})}]$ . Os cálculos foram feitos confrontando os valores obtidos entre as distintas cultivares e não entre inoculado e o controle. Foi atribuída uma “linha de corte” de duas vezes valor da expressão. O valor da linha de corte é estabelecido pelo grupo de trabalho e varia geralmente de uma a duas vezes o padrão de expressão do fenômeno contrastante.

Nos gráficos MA plot, o eixo M demonstra a quantidade de vezes que uma seqüência esta mais expressa em uma das cultivares em relação a outra cultivar. Nesses gráficos os valores positivos representam as seqüências diferencialmente expressas na cultivar resistente, e os valores negativos as seqüências mais expressas na cultivar susceptível. O eixo A do gráfico representa valores obtidos para comprimir as informações e tornar possível a visualização destas, não sendo relevantes em questão das diferenças de expressão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação *in silico* de genes diferentemente expressos em *H. brasilienses* infectada com *M. ulei*.

As seqüências obtidas nas bibliotecas SSH representam transcritos altamente expressos nas cultivares resistentes (MDF 180) e suscetíveis (PB 314) infectadas com *M. ulei*. Após anotação das seqüências foram obtidos 353 reads que apresentam homologia a genes relacionados aos mecanismos de reconhecimento, sinalização, transporte e defesa de plantas. A comparação das bibliotecas permitiu uma análise qualitativa, servindo como indicativo de presença ou ausência de uma seqüência em determinada biblioteca.

#### 4.1.1. Defesa

Na classe funcional que envolve seqüências relacionadas a mecanismos de defesa, foram identificadas na biblioteca da cultivar resistente 31 seqüências somente aqui expressas (não sendo identificadas em nenhuma das outras bibliotecas). Estas seqüências foram subdivididas em 7 subgrupos, sendo eles: Estresse oxidativo; Proteases e/ou inibidores de proteases; PRs ou Genes R; Tolerância a diferentes estresses; Combate a morte celular programada; Metabolismo de fenilpropanóides; e Outras proteínas (Tabela 3).

Na biblioteca da cultivar suscetível apenas 2 seqüências foram identificadas, sendo que a primeira codifica uma proteína de tolerância a metais e a segunda proteína de resistência a doença Cf-5, primeiramente encontrada em tomates sob

ataques do *Cladosporium fulvum*, e com função atribuída ao reconhecimento e disparo dos mecanismos de defesa nesse patossistema (WANG et al., 2001) .

**Tabela 3.** Seqüências relacionadas com mecanismos de defesa somente identificadas na biblioteca SSH 4-28 d.a.i. da cultivar MDF 180

Subgrupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Estresse oxidativo	catalase 2 [Capsicum_annuum]	4,00E-11	gb AAM97541.1
	Glutathione S-transferase	9E-08	Q9FQF3.1
	monodehydroascorbate reductase [Pisum_sativum]	1,00E-65	gb AAU11490.1
	putative peroxidase [Zinnia_elegans]	6,00E-10	emb CAH69536.1
	thioredoxin-dependent peroxidase [Plantago_major]	4,00E-47	emb CAH58634.1
	Manganese SOD(Fragment).	0,000005	Q7Z8K5.1
	monodehydroascorbate reductase I [Pisum_sativum]	0,00002	gb AAU11490.1
Proteases e/ou inibidores de proteases	Cysteine protease 1 [Plantago_major]	1,00E-59	emb CAH59426.1
	Cystatin [Castanea sativa]	2E-08	emb CAA11899.1
	cysteine protease inhibitor [Populus_tremula]	3,00E-48	emb CAH57572.1
	pectinesterase inhibitor	0,00003	ref NP_190322.1
	hevine [Hevea_brasiliensis]	9,00E-17	emb CAC19408.1
	serpin [Cucumis_sativus]	2,00E-41	emb CAI43280.1
	Subtilase [Arabidopsis_thaliana]	2,00E-16	ref NP_567972.1
PRs ou Genes R	putative PRP [Cucumis_sativus]	2,00E-12	emb CAF33484.1
	PR1a precursor [Glycine_max]	3,00E-15	gb AAD33696.1
	similar to disease resistance proteins [A. thaliana]	2,00E-14	gb AAD25626.1
	disease resistance-like protein [A. thaliana]	5,00E-16	emb CAB64227.1
	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase1.	1,00E-12	Q75WU3.1
Tolerancia a diferentes estresses	heat shock factor binding protein 2 [Zea_mays]	4,00E-21	gb AAR18070.1
	17.5 kDa class I heat shock protein [Carica papaya]	1,00E-15	gb AAR25848.1
	heat shock protein 70 [Nicotiana tabacum]	1,00E-09	emb CAA44820.1
	Putative heat shock protein	0,000004	Q9C911.1
Combate a morte celular programada	Bax inhibitor [Lycopersicon_esculentum]	6,00E-31	gb AAR28754.1
	defender against cell death [Suberites domuncula]	1,00E-12	emb CAF74918.1
Metabolismo de fenilpropanoides	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	4,00E-10	O64969.1
	putative cinnamoyl-CoA reductase [Solanum demissum]	2,00E-57	gb AAT39306.1
Outras proteínas	hypersensitive-induced reaction protein 2	3,00E-18	gb AAN17463.1
	hydroxycinnamoyltransferase (Fragment).	0,000003	Q70Q37.1
	submergence induced protein 2-like [Vitis vinifera]	1,00E-19	gb AAO12871.1
	BURP domain-containing protein [G. hirsutum]	1,00E-24	gb AAQ22345.1



### 4.1.2. Sinalização celular

Na classe funcional que envolve seqüências relacionadas as vias de sinalização celular foram identificadas 19 seqüências diferencialmente expressas na cultivar MDF 180, pertencentes aos subgrupos: sinalização mediada por kinases, contendo 8 *reads*; proteínas relacionadas com influxo/efluxo de cálcio com 3 *reads*; e outras proteínas associadas a sinalização celular, com 8 *reads* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Seqüências relacionadas com as vias de sinalização oriundas da biblioteca SSH 4-28 d.a.i. da cultivar MDF 180.

Subgrupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Sinalização mediada por kinases	nucleoside diphosphate kinase [Hyacinthus orientalis]	4,00E-38	gb AAT08712.1
	kinase [Arabidopsis thaliana]	2,00E-21	ref NP_191667.2
	putative kinase interacting protein [Solanum demissum]	6,00E-29	gb AAU90326.1
	cyclin dependent kinase (cdc2b) [Chenopodium rubrum]	1,00E-28	emb CAC17703.1
	B1-type cyclin dependent kinase [Lycopersicon esculentum]	3,00E-19	emb CAC15503.1
	SOYBN Putative receptor-like protein kinase 3.	0,00003	Q49N13.1
	HEVBR Phosphomevalonate kinase.	1E-08	Q944G1.1
	MEDTR Prefoldin; Protein kinase PKN/PRK1, effector.	9,00E-34	Q1T3X4.1
Proteínas relacionadas com influxo/efluxo de cálcio	MEDTR IQ calmodulin-binding region.	0,00001	Q1T2K4.1
	calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	6,00E-36	ref NP_194377.1
	DAUCA Calmodulin cam-201.	0,000002	Q6DN35.1
Outras proteínas de sinalização	FSGTP1 [Fagus_sylvatica]	0,0000001	emb CAA67153.1
	putative FK506-binding protein [Oryza sativa]	1,00E-28	ref XP_469487.1
	Rho GDP dissociation inhibitor 2 [Medicago_truncatula]	0,00001	emb CAF02296.1
	MEDTR AMP-dependent synthetase and ligase.	3,00E-31	Q1S4D1.1
	reversibly glycosylated polypeptide [Gossypium_hirsutum]	3,00E-42	emb CAC83750.1
	cyclophilin [Digitalis_lanata]	3,00E-46	emb CAA69598.1
	PLAYO Putative yir4 protein.	0.0	Q7R9F5.1
	AKIN beta3 [Medicago truncatula]	2,00E-28	gb AAO61678.1

Na biblioteca da cultivar suscetível foi identificada uma seqüência relacionada com o processo de sinalização, que apresentou homologia a uma proteína que contém um domínio ML, cujo papel nos mecanismos de transmissão de sinais não está claro.

### 4.1.3. Vias de hormônios

Sete seqüências relacionadas às vias de hormônios foram identificadas somente na biblioteca da cultivar MDF 180 (Tabela 5). Para a biblioteca da cultivar suscetível, não foram identificadas seqüências específicas diferencialmente expressas relacionadas com as vias de hormônios.

**Tabela 5.** Seqüências relacionadas com as vias de hormônios, identificadas somente na biblioteca SSH 4-28 d.a.i. da cultivar MDF 180.

Grupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Hormônios	auxin-induced CP12 domain-containing protein	6,00E-23	gb AAV63570.1
	putative polyprotein [Oryza sativa]	2,00E-66	ref NP_921503.1
	type-B response regulator [Catharanthus roseus]	1,00E-15	gb AAQ10678.1
	Putative response regulator 10 [Oryza sativa]	2,00E-11	ref NP_912485.1
	auxin-regulated protein [Phaseolus vulgaris]	0,000003	gb AAN65371.1
	S-adenosyl methionine synthase [Solanum brevidens]	8,00E-34	gb AAT47716.1
	NICSY Gibberellin 20-oxidase 1	0,00003	Q8RVP1.1

### 4.1.4. Transportadores

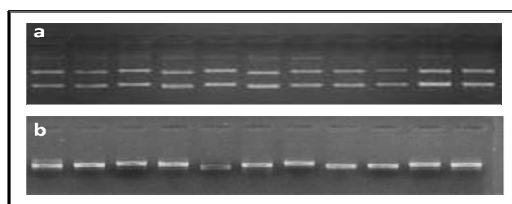
Para proteínas de transporte, foram identificados na cultivar resistente 12 seqüências específicas (Tabela 6). Um precursor mitocondrial de uma cadeia beta de uma ATP sintase foi identificada na cultivar suscetível.

**Tabela 6.** Seqüências relacionadas com as vias de hormônios oriundas da biblioteca SSH 4-28 d.a.i. da cultivar MDF 180.

Grupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Transportadores	Importin alpha-like protein [A. thaliana]	7,00E-35	emb CAA74966.1
	Ycf10 [Castanea sativa]	4,00E-09	gb AAT12418.1
	ARATH Bet1-like protein	3,00E-09	Q8L9S0.1
	amino acid permease [A. thaliana]	1,00E-48	ref NP_172472.1
	plasma intrinsic protein 2,1 [Juglans regia]	1,00E-57	gb AAO39007.1
	SEC14-like protein [A. thaliana]	2,00E-26	emb CAB80580.1
	putative phosphate translocator [Oryza sativa]	1E-08	gb AAV24764.1
	probable transport protein Sec61 alpha subunit	5,00E-46	gb AAU84942.1
	CAX [Suaeda maritima]	6,00E-38	gb AAR99078.1
	putative inward rectifying potassium channel [Solanum tuberosum]	5,00E-47	emb CAA70947.1
	ABCF-type protein [Zea mays]	1,00E-26	gb AAT51734.1
	CTV.3 [Poncirus trifoliata]	2,00E-09	gb AAN62337.1

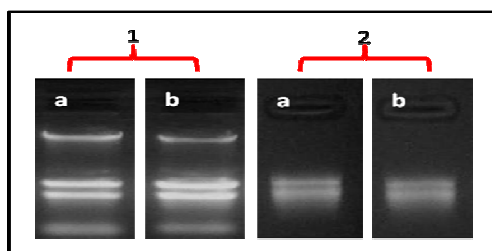
## 4.2. Análise da expressão gênica das seqüências via macroarranjos

Para análise da expressão gênica das seqüências obtidas a partir das bibliotecas subtrativas foi realizada extração do DNA plasmidial (Figura 5a) e amplificação por PCR das 353 colônias das bibliotecas subtrativas cujo as seqüências apresentaram homologia com genes relacionados aos mecanismos de reconhecimento, sinalização, transporte e defesa de plantas (Figura 5b).



**Figura 5.** Extração do DNA plasmidial e amplificação dos fragmentos de interesse via reação em cadeia da polimerase em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 5a) Amostras A1 a A11 da placa 01 do set unigen; 5b) Amplificação via PCR das amostras anteriormente citadas.

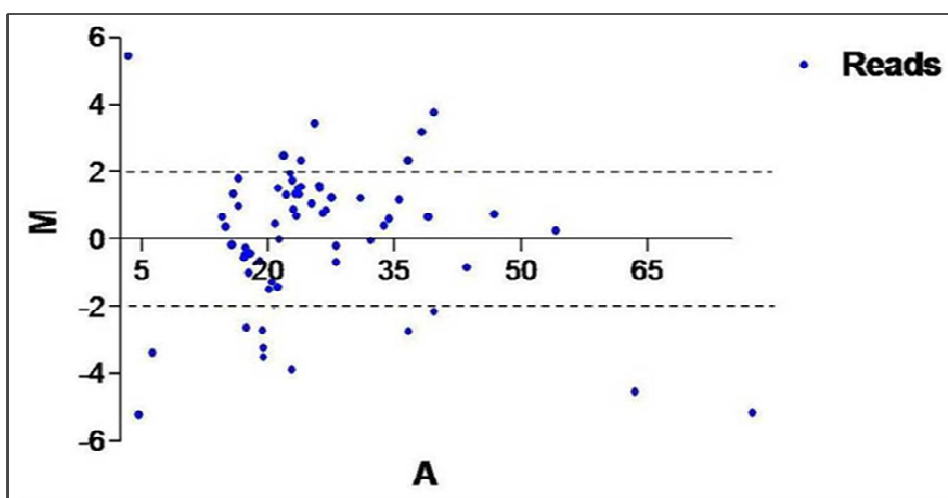
Para obtenção dos transcritos a serem hibridados com as sondas de cDNA previamente fixados nas membranas de náilon, foi realizada extração do RNA total de folíolos jovens 10 dias após infecção com *M.ulei*, da cultivar suscetível e da resistente (Figura 6.1a e 6.1b), tratamento com DNase I (Figura 6.2a e 6.2b) e transcrição reversa para obtenção das sondas a serem hibridadas com as membranas de náilon.



**Figura 6.** Extração do RNA total e tratamento com DNase I de folhas coletadas 10 dias após inoculação com o *M.ulei*, visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo,. 6.1a) Extração realizada a partir de folhas da cultivar MDF 180; 6.1b) Extração realizada a partir de folhas da cultivar PB 314; 6.2a) Tratamento com DNase do RNA total obtido da cultivar MDF 180; 6.2b) Tratamento com DNase do RNA total obtido da cultivar PB 314.

#### 4.2.1. Análise da expressão diferencial dos genes associados a respostas de defesa e estresse.

Neste grupo funcional 151 seqüências foram fixadas nas membranas. Dentre as seqüências analisadas, 40 foram mais expressas na planta resistente e 21 na suscetível (Figura 7), as 90 restantes não apresentaram mudanças significativas no perfil transcricional das duas cultivares analisadas.



**Figura 7.** Gráfico MA-plot da análise da expressão diferencial dos genes relacionados a defesa. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF 180 e os valores negativos a genes diferencialmente expressos na cultivar PB 314.

Dentre as seqüências diferentemente expressas, 7 ficaram acima da linha de corte na cultivar resistente (Tabela 7). Na cultivar suscetível foi observado que 11 seqüências foram significativamente mais expressas em relação à cultivar resistente (Tabela 8).

**Tabela 7.** Seqüências das respostas de defesa com diferenças significativas de expressão na cultivar resistente, quando comparada a suscetível.

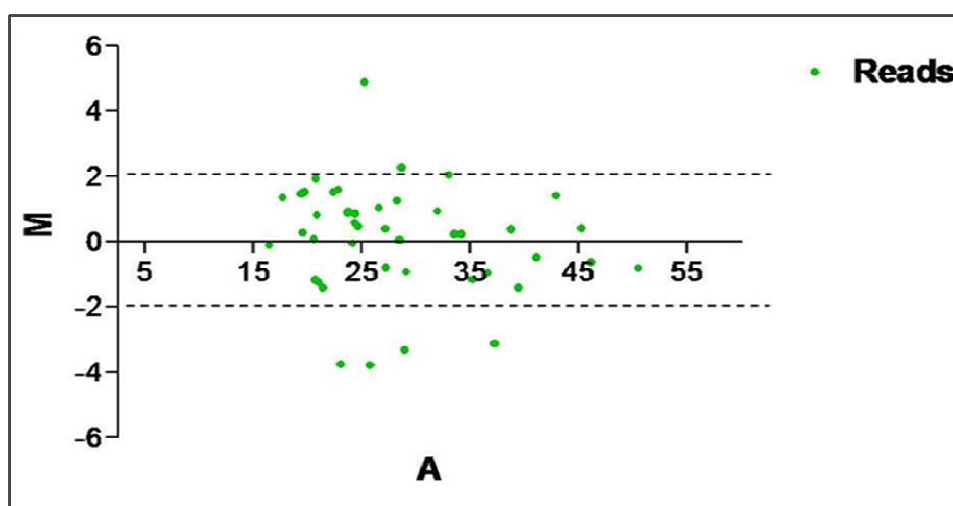
--

**Tabela 8.** Sequências das respostas de defesa com diferenças significativas de expressão na cultivar suscetível, quando comparada a resistente.

Table content is redacted (black box).

#### 4.2.2. Análise da expressão diferencial dos genes das vias de sinalização

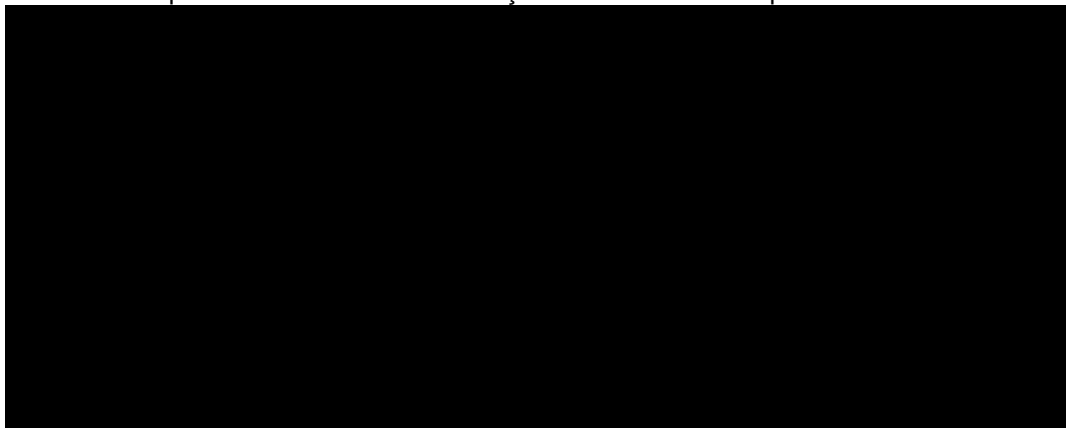
A expressão diferencial das 91 seqüências com função diretamente relacionada com as vias de sinalização foi avaliada por macroarranjos e pode-se constatar que 26 são mais expressas na cultivar resistente e que 17 apresentavam maior expressão na cultivar suscetível (Figura 8). As outras 48 seqüências não apresentaram diferença no padrão de expressão nas distintas cultivares.



**Figura 8.** Análise da expressão diferencial dos genes relacionados às vias de sinalização. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF 180 e os valores negativos a genes diferencialmente expressos na cultivar PB 314.

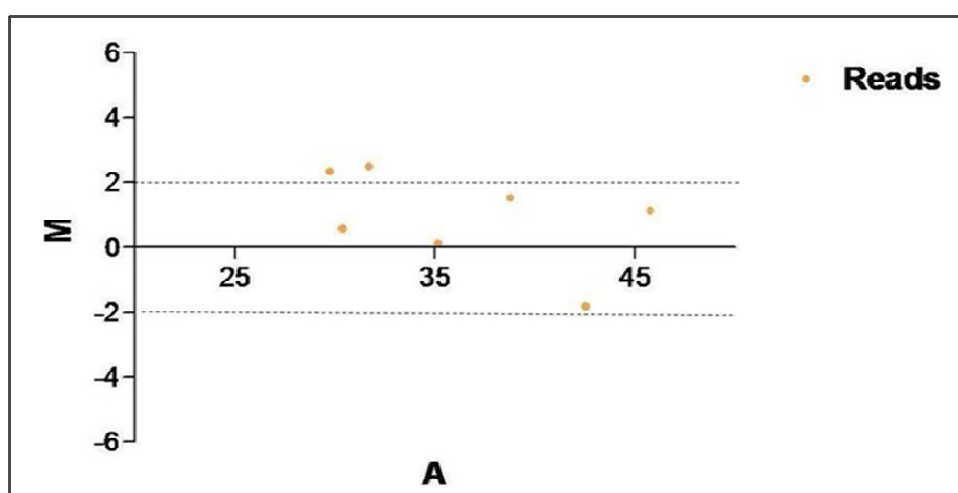
Destas seqüências diferentemente expressas, 7 apresentaram modificações significativas no perfil de expressão, sendo que 3 foram identificadas na cultivar resistente e 4 na suscetível (Tabela 9).

**Tabela 9.** Seqüências das vias de sinalização diferentemente expressas entre as cultivares.



#### 4.2.3. Análise da expressão diferencial dos genes das vias dos hormônios

Dos 31 reads com função relacionada com as vias de sinalização mediadas por hormônios, 7 apresentaram expressão diferencial entre as cultivares. Sendo que 6 estavam mais expressos na cultivar resistente, e 1 foi mais expresso na cultivar suscetível (Figura 9).



**Figura 9.** Análise da expressão diferencial dos genes relacionados às vias de hormônios. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF 180 e os valores negativos a genes diferencialmente expressos na cultivar PB 314.

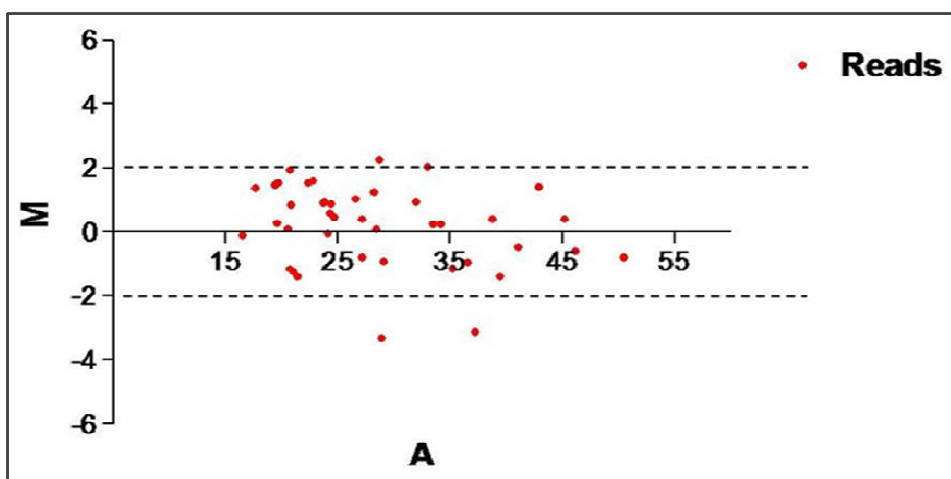
Quando a expressão diferencial é analisada considerando a linha de corte estabelecida, pode-se visualizar que apenas duas seqüências estão significativamente mais expressas na cultivar resistente em relação a outra cultivar (Tabela 10).

**Tabela 10.** Seqüências das respostas de defesa com diferenças significativas de expressão na cultivar resistente em relação a cultivar suscetível.

--

#### 4.2.4. Análise da expressão diferencial dos genes de proteínas de transporte

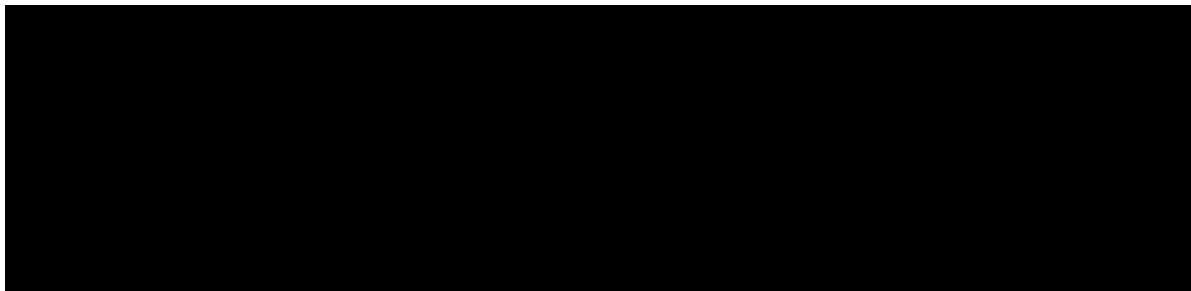
Foram analisadas por macroarranjos 80 seqüências associadas ao transporte celular. Dessas, 40 apresentaram perfil de expressão diferencial entre os cultivares, sendo que 25 seqüências demonstraram ser mais expressas na cultivar resistente e 15 na cultivar suscetível (Figura 10).



**Figura 10.** Análise da expressão diferencial dos genes relacionados à proteínas de transporte. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF 180 e os valores negativos a genes diferencialmente expressos na cultivar PB 314.

Quando é considerada a linha de corte atribuída visualiza-se que, dentre as 40 seqüências diferencialmente expressas, apenas 4 apresentam modificações significativas no perfil de expressão, 2 sendo mais expressas na cultivar resistente e 2 na suscetível (Tabela 11).

**Tabela 11.** Seqüências relacionadas à proteínas de transporte diferentemente expressas entre as cultivares.





## 5. DISCUSSÃO

Esse estudo foi realizado com o objetivo de identificar seqüências diferentemente expressas induzidas pelo ataque do *M.ulei* em bibliotecas SSH de folhas de seringueira inoculadas. Posteriormente foi feita análise de expressão diferencial utilizando a técnica de macroarranjos, buscando identificar genes significativamente mais expressos envolvidos nas vias de sinalização, transporte, hormônios e defesa da planta, tanto na cultivar suscetível quanto na resistente.

A comparação escolhida para análise de expressão gênica entre cultivares contrastantes foi a partir das bibliotecas SSH de 4-28 dai. Esse período foi escolhido porque neste intervalo de tempo ocorre nas cultivares suscetíveis a mudança de fase sexual do fungo, fenômeno não identificado na cultivar parcialmente resistente aqui estudada. Diante disso os estudos de expressão gênica poderiam ajudar a entender quais mecanismos moleculares estariam atuando para impedir a mudança de fase sexual na cultivar MDF 180.

### **5.1. Análises *in silico* de genes diferentemente expressos em *H. brasilienses* infectada com *M. ulei*, oriundos de bibliotecas SSH 4-28 d.a.i.**

A comparação do número de seqüências obtidos nas bibliotecas SSH 4-28 dai das cultivares PB 314 e MDF 180 revela grande diferença no conjunto de seqüências únicas encontrados entre as cultivares (ver Tabela 2). Na cultivar MDF 180 foi observado maior número de seqüências e uma baixa redundância, contrariamente ao que foi identificado na cultivar suscetível.

Dentre os motivos que podem ter causado essa diferença no perfil de transcritos podem se destacar os seguintes: Possíveis problemas técnicos na construção das bibliotecas SSH, que podem ter ocorrido em diferentes partes de sua execução. Outra justificativa plausível e condizente com os resultados alcançados nos macroarranjos desse estudo é que a cultivar resistente dispõe de um processo de reconhecimento e defesa mais efetivo e com maior número de seqüências distintas envolvidas, quando comparadas com a cultivar suscetível; ou ainda que o fungo ao conseguir se estabelecer na planta atuaria de maneira a silenciar a expressão de genes (principalmente de defesa) e estimularia a expressão de genes das rotas metabólicas, o que acarretaria em uma menor diversidade entre os transcritos. Novos estudos devem ser realizados no intuito de melhor entender essas diferenças de seqüências encontradas entre as bibliotecas.

Na comparação das seqüências obtidas entre as bibliotecas com funções atribuídas entre as vias de sinalização, transporte, hormônios e defesa da planta. Foram identificadas 69 seqüências diferentemente expressas na biblioteca resistente, sendo que o grupo funcional que apresentou maior número de seqüências únicas foi o com função relacionada a defesa vegetal (31). O número de seqüências somente identificadas na biblioteca da cultivar suscetível foi significativamente menor (4), o que pode ser um indicio de que ocorreram problemas técnicos durante a construção das bibliotecas SSH ou que o patógeno estaria bloqueando as vias de sinalização de defesa nessa cultivar e conseqüentemente impedindo o disparo da HR.

Dentre as seqüências diferentemente expressas identificadas, destaca-se a grande quantidade de genes codificadores de proteínas relacionadas com o estresse oxidativo, dentre elas: catalase; manganese SOD; glutathione S-transferase; peroxidase; dentre outras. Isso pode ser devido a ocorrência de diversas formas de espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno, com papéis atribuídos as mudanças bioquímicas e fisiológicas sob condições de estresse ambiental, atividade antimicrobiana, atuação em vias de sinalização, ação hormonal, crescimento e desenvolvimento da planta (KOTCHONI e GACHOMO, 2006; WOHLGEMUTH et al., 2002; DAT et al., 2000). Observou-se também a ocorrência de 3 seqüências diferentemente expressas relacionadas ao influxo e efluxo de íons

Ca<sup>+</sup> na cultivar resistente, que reforçam a hipótese que a resistência dessa planta esta baseada na criação e tolerância de uma grande explosão oxidativa.

No grupo funcional que envolviam genes das vias de sinalização foram identificadas seqüências diferentemente expressas na cultivar resistente envolvidas com a cascata de sinalização desencadeada por reações de fosforilação em proteínas mitógeno ativadas kinases (MAPK), tais como: Protein kinase PKN/PRK1; B1-type cyclin dependent kinase; Putative receptor-like protein kinase 3; além da própria Kinase. O que nos permite sugerir que essa via de sinalização teria um importante papel no processo de resistência de *H.brasiliensis* ao *M.ulei*.

Uma das seqüências encontradas com expressão diferencial está relacionada com a auxina, que é um hormônio que atua de forma integrada com as MAP Kinases em suas vias de sinalização (WRZACZEK e HIRT, 2001), o que é mais um indicativo que o processo de sinalização nessa cultivar pode ser dependente da atuação dessas proteínas e novos estudos devem ser feitos para confirmar ou refutar essa hipótese.

Outra proteína com expressão diferencial identificada codifica uma proteína relacionada à taumatina, que é envolvida com resposta de defesa, sendo que vários membros da família das taumatinas têm demonstrado *in vitro* a capacidade de inibir o crescimento e a esporulação de diversos fungos (SINGH et al., 1989).

A presença de genes diferentemente expressos somente encontrados na biblioteca SSH 4-28 da resistente, relacionados com a síntese de fenilpropanóides, fortalecem a idéia de que os compostos fenólicos, são componentes diretos do mecanismo de resistência parcial observado na cultivar MDF 180, idéia essa reforçada pelos estudos de Sambugaro e colaboradores (2004) que observaram a deposição de compostos fenólicos em cortes anatômicos foliares a partir de 10 após de inoculação. Segundo Garcia e colaboradores (1995), outro componente importante na contenção do patógeno no local da infecção é a ocorrência de lignificação dos tecidos vegetais e acúmulo de escopoletina que pode ser responsável pela presença do fungo dentro da zona necrótica em clones parcialmente resistentes. Liberei (2007) afirma que a contenção do patógeno também é atribuído a liberação de cianeto de hidrogênio (HCN) pelas folhas que estão sob ataque em adição ao metabolismo de compostos fenólicos e a lignificação

em seringueira. Essas informações só reforçam o quanto e complexo o mecanismo de resistência parcial observado na cultivar MDF 180.

O perfil das seqüências identificadas nas bibliotecas da interação *Hevea-Microcyclus* é semelhante aos encontrados por Cramer e Lawrence (2006), que identificaram genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro entre o fungo necrotrófico *Alternaria brassicola* e a planta *Brassica oleracea*, a partir de bibliotecas SSH da interação. Dentre as seqüências identificadas nesse estudo destacam-se: genes do fungo envolvidos no processo de penetração no hospedeiro; proteínas envolvidas nas vias de sinalização; estresse oxidativo; e proteínas relacionadas com hormônios vegetais, como fatores de transcrição WRKY. Segundo os autores, um dos maiores obstáculos referentes a estudos de identificação de ESTs em interações planta-patógeno é a identificação precisa da fonte do EST, que tanto pode ser do hospedeiro quanto do patógeno. No estudo da interação da seringueira ao *M.ulei*, não foi precisamente identificada a fonte dos ESTs observados nas bibliotecas SSH, sendo necessários estudos posteriores com esse intuito, como por exemplo a criação de bibliotecas de ESTs apenas com seqüências do fungo, o que possibilitaria uma posterior comparação e identificação da fonte dos transcritos aqui analisadas.

Em seus estudos Leal Jr. e colaboradores, criaram duas bibliotecas enriquecidas para seqüências diferencialmente expressas durante a interação entre o *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa*, nas quais foram obtidas 187 seqüências únicas, sendo 83 da biblioteca SSH da cultivar suscetível e 104 da biblioteca SSH da cultivar resistente. As seqüências identificadas foram distribuídas entre as seguintes classes funcionais: Resposta a stress; Metabolismo; Metabolismo energético; Metabolismo de proteínas; Metabolismo de DNA e RNA; Sinalização; Biogênese e organização celular; Transporte celular; e Processos biológicos desconhecidos. Posteriormente esse autores selecionaram 23 seqüências, escolhidas por representar as principais classes funcionais envolvidas nos mecanismos de resistência e/ou defesa, para validação do perfil de expressão via PCR em tempo real. E constataram que de maneira geral as mudanças de expressão na cultivar suscetível foram moderadas, diferente do observado na cultivar resistente que apresentou modificações intensas no perfil de expressão de diversos genes (peroxidases, LRR proteínas e cisteína proteases), principalmente 48 e 120 horas após a infecção.

Em outro patossistema, Fernandez e colaboradores (2004) analisaram a expressão de genes de *Coffea arabica* L. durante a infecção pelo fungo *Hemileia vastatrix*, com o intuito de isolar genes dos mecanismos de resistência da planta. Para tanto construíram duas bibliotecas SSH, que geraram 527 ESTs não-redundantes classificados em sete categorias funcionais. Sendo que 26% das ESTs identificadas apresentaram semelhança a genes relacionados com os mecanismos de defesa e componentes das vias de sinalização. Dentre as seqüências desses grupos funcionais, existem seqüências que também são encontradas nas bibliotecas da interação *Hevea* - *M.ulei* e que apresentam expressão diferencial entre as cultivares resistente e suscetível, tais como: Heat shock proteínas; PR 10; peroxidases; Glutathione redutase; e Cisteína protease. O papel de cada uma dessas seqüências nas interações as quais foram identificadas, ainda não está claro em nenhum dos patossistemas, porém pode-se observar que os mecanismos de defesa que envolvem as proteínas citadas é conservado e comum em diferentes interações planta-patógeno.

A identificação de genes relacionados aos processos de resistência de plantas a patógenos, principalmente via construção de bibliotecas de ESTs, surgiu como uma alternativa para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nestas interações, que até o momento não são bem claros. Diversos foram os patossistemas que já foram estudados por essas técnicas e que muito contribuíram para o entendimento da dinâmica da interação, porém muito ainda têm a ser esclarecido e quanto mais estudos tiverem esse objetivo em comum, maior será o entendimento a esse respeito (VAN BAARLEN et al., GLAZEBROOK, 2005).

## **5.2. Análise da expressão diferencial dos genes via macroarranjos.**

Foi determinado o tempo de 10 dias após a infecção do *M.ulei* em folíolos de seringueira para o estudo de expressão gênica por que é nesse período que em cultivares suscetíveis o fungo muda de fase sexual e causa a lesão estromática, o que não é observado na cultivar MDF 180 (SAMBUGARO et al., LE GUEN et al., 2008). Diante disso buscou-se uma visão a nível transcricional dos fenômenos

moleculares que ocorrem na cultivar resistente que impedem a formação do estromata.

Das 353 seqüências estudadas para análise de expressão gênica via macroarranjos, 151 apresentaram perfil transcricional distinto entre as cultivares 10 dias após a inoculação. Destas 97 foram mais expressas na cultivar resistente e 54 na cultivar suscetível, as 202 demais seqüências fixadas nas membranas não apresentaram diferenças no perfil transcricional observadas nesse estudo.

Os resultados referentes as análises de expressão via macroarranjos mostram que existe diferença de expressão significativa de genes nas quatro classes funcionais estudadas na cultivar resistente, quando comparadas a expressão desses genes na cultivar suscetível. Porém, é válido ressaltar que a ausência de repetições impossibilita uma maior segurança em relação a estas informações devido a não existência de confiabilidade estatística.

Ao analisar as informações obtidas nos macroarranjos pode-se observar que entre as seqüências relacionadas a estresse e defesa existe até seis vezes mais expressão na cultivar resistente, o que poderia ser um indicativo de papel crucial desse gene no processo de resistência. Porém, apenas com a análise via macroarranjo, não é possível garantir esse papel sendo necessária a realização de testes complementares, como estudos de expressão via PCR em tempo real, com estes genes específicos.

Dentre as seqüências que mais estão expressas na planta resistente destacam-se: putative papain like cysteine proteinase, que teve uma expressão 6,88 vezes superior nessa cultivar; fTSH protease, 5,23 vezes mais expressa; a alcohol oxidase, com expressão 4,56 vezes superior; além das oxiredutases (peroxidase, peroxidase catiônica, MnSOD), proteínas relacionadas à patogênese (NtPRp 27, PR 10) e de tolerância a diferentes estresses. Dentre as proteínas destacadas, buscou-se saber possíveis formas de atuação em outros sistemas de interação planta-patógeno e constatou-se que:

- As SOD's são enzimas catalisadoras da dismutação do  $2O_2^-$  e  $2H^+$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ , estas são classificadas de acordo com seus cofatores metais que podem ser Cu/Zn, Mn ou Fe. As plantas, normalmente, têm Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe- SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria. As SOD's são consideradas importantes agentes antioxidantes, porém, em elevadas concentrações nas células

animais e bacterianas, podem induzir disfunções e morte celular (BAKER e ORLANDI, 1995). Em seus estudos Konishi e colaboradores (2005), observaram uma maior expressão dessa classe de proteínas após tratamento de raízes de arroz com hormônios, tais como giberelinas ou etileno. A atuação destas proteínas na inativação de ERO's e a sua maior expressão influenciada por hormônios vegetais poderiam explicar a presença dessas proteínas na interação *Hevea-Microcyclus*, confirmada por sua identificação nas bibliotecas SSH e sua expressão diferencial nos macroarranjos;

- As peroxidases são as principais enzimas de detoxificação do  $H_2O_2$  em plantas, estas convertem  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , podendo fazer essa reação diretamente ou pela intervenção de outros substratos tais como, metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (BREUSEGEM et al., 2002). Essas enzimas também estão presentes nos patógenos como meios de evitar a explosão oxidativa produzida pela planta no momento do ataque (QURESHI et al., 2007);

- A álcool oxidase é uma oxidoreductase cuja função está relacionada ao disparo da explosão oxidativa, pois esta enzima catalisa a quebra de uma molécula de álcool primário que adicionada a  $O_2$ , gera peróxido de hidrogênio (CHANG et al., 2004).

- Proteínas relacionadas à patogênese como a PR10, são encontradas em outras interações planta-patógeno e tem sido demonstrado que elas possuem propriedades ribonucleotídicas, além da capacidade de formar ligações com ácidos graxos, flavonóides e citocininas, o que lhe sugere funções relacionadas a transporte ou armazenagem e envolvimento nas vias de sinalização de fitohormônios (PARK et al., 2004; MOGENSEN et al., 2002);

- Outra subclasse funcional que teve expressão diferencial, foi a que envolve seqüências com homologia a proteases. Estas representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos independente da ocorrência de qualquer tipo de estresse, pois atuam clivando ligações peptídicas que podem tanto neutralizar uma proteína, quanto permitir que ela assuma uma conformação ativa, que no caso dos mecanismos de defesa pode servir como estímulos que desencadeiam as vias de sinalização (QURESHI, et al., 2007).

A diferença nos níveis de expressão das classes de proteínas acima citados podem estar diretamente relacionada com a ocorrência da resistência de *Hevea* ao

*M. ulei*. Porém novos estudos devem ser realizados para melhor compreender a atuação destas proteínas nessa interação.

Neste estudo foram identificadas diversas seqüências relacionadas com as vias de sinalização e foi demonstrada expressão diferencial para 7 destas sendo 3 na cultivar resistente (todas envolvidas no sistema de sinalização baseado em quinases) e 4 na suscetível (ver tabela 9).

O processo de sinalização celular é complexo e tem se atribuído as vias envolvendo proteínas kinases, uma das principais etapas no processo de reconhecimento de um patógeno devido a serem intermediárias na transmissão de sinais, conectando a percepção de estímulos externos a respostas celulares (WRZACZEK e HIRT, 2001). A cascata de sinalização desencadeada MAPKs é uma das maiores e mais conservadas evolutivamente, vias de sinalização que são utilizadas para transmitir estímulos extracelulares e desencadear respostas intracelulares entre eucariotos (YAMAMIZO et al., 2006).

Semelhante a este estudo Dabbas e colaboradores (2006), utilizaram a técnica de macroarranjos para identificação de genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans* o agente causal da escaldadura da folha em duas variedades da planta. Dentre as seqüências com diferentes perfis de expressão destacam-se: genes da vias de síntese de isoprenóides; proteínas LRR; proteínas relacionadas a lignificação; tolerância a estresse térmico; e sistemas de defesa e adaptação a o ambiente. Seqüências relacionadas a expansão da parede celular, detoxificação e transporte de auxina apresentaram-se reprimidas na cultivar resistente. Na cultivar suscetível foram reprimidas ESTs relacionadas a genes de defesa, biossíntese de etileno e regulação de transcrição. Neste estudo é possível identificar seqüências em comum com as diferencialmente expressas na interação *Hevea* - *M.ulei*, ou com funcionalidade semelhante, principalmente proteínas relacionadas com processos de lignificação da parede celular e estresse oxidativo.

Em um estudo semelhante ao acima descrito, Ferro e colaboradores (2007) analisaram o padrão de expressão gênica de duas variedades de cana-de-acucar a *Leifsonia xyli*, bactéria causadora do raquitismo da soqueira nessa planta. Nesse estudo observa-se que a cultivar suscetível, possui poucas seqüências diferencialmente expressas na presença do patógeno, o que leva aos autores a



sugerir que esta variedade não dispara a ativação de mecanismos de defesa frente ao ataque do patógeno. Por outro lado quando analisada o perfil da expressão gênica da variedade tolerante, observa-se maior número de genes diferencialmente expressos em relação a variedade suscetível, permitindo aos autores sugerir que os mecanismo de defesa nesta variedade foram ativados. O que é descrito aqui foi também identificado no estudo da expressão de genes vias macroarranjos da interação Hevea-Microcyclus, em que houve pouca expressão diferencial de genes na cultivar suscetível e maior expressão na cultivar resistente, nos levando a apoiar as sugestões de Ferro e colaboradores (2007).

### **5.3. Seqüências diferentemente expressas na biblioteca SSH da cultivar resistente com expressão gênica significativamente distinta 10 dias após inoculação com *M.ulei* em relação a cultivar suscetível.**

Dentre as sequencias estudadas nesta pesquisa duas apresentaram expressão diferencial sendo identificadas apenas nas bibliotecas SSH da cultivar resistente no período de 4-28 d.a.i. e apresentaram expressão gênica significativamente superior na cultivar resistente 10 dias após inoculação em relação a cultivar suscetível avaliada pelos macroarranjos , sendo elas: Subtilase e hydroxycinnamoyl-CoA transferase.

Subtilasin-Like proteases (Subtilases) são serinas peptidases que apresentam uma tríade catalítica de aminoácidos, com aspartato, histidina e serina, e dentro das proteases a família das subtilases é encontrada em bactérias, leveduras, fungos filamentosos, plantas e animais. São enzimas proteolíticas que dependem de um resíduo de serina para ativação de sua atividade catalítica e diferem de outras serinas peptidases por seu envoltório protéico. Todas as subtilases identificadas em plantas até agora tem sido agrupada dentro da subfamília Pirolisina (RAUTENGARTEN et al., 2005). Geralmente suas funções são atribuídas à maturação de hormônios pépticos, fatores de crescimento e receptores de proteínas (MEICHTRY et al., 1999). Nos vegetais estão geralmente envolvidas em processos degradativos e processamento de pré-proteínas (POPOVIC et al., 2002).

Subtilases extracelulares tem sido associada com interações fungo-hospedeiro e em interações com plantas estariam atuando tendo como alvo hidroxiprolinas ricas em glicoproteínas como as extensinas, as quais possuem um papel chave entre as proteínas de membrana (DI PIETRO et al., 2001). Segundo Alexandre e colaboradores (1994), quando produzidas pelo fungo estas proteases podem contribuir para a inativação de componentes protéicos das respostas de defesa vegetais, tais como chitinases e B-1,3-Glucanases. Como é encontrada tanto em plantas como em fungos estas proteínas podem estar sendo usadas por ambos organismos (*Hevea brasiliensis* x *Microcyclus ulei*) como mecanismos de auto-defesa. Diante disso novos estudos devem ser desenvolvidos no intuito de melhor caracterizar a expressão dessas proteínas e identificar o organismo que a esta produzindo nesta interação.

A enzima hydroxycinnamoyl-CoA transferase cataliza em plantas a síntese de amidas acidas hidroxicianimicas de tiramina que são induzidas em resposta a uma variedade de condições de estresses, incluindo ataques de patógenos, exposição a ozônio e seca. Essas amidas tem comumente sido encontradas associadas em frações de paredes celulares e tem um papel na formação da barreiras fenólicas, tornando-as mais resistente a degradação enzimática e inibindo o crescimento direcional das hifas fungicas (NEGREL e JAVELLI, 1997; YU e FACCHINI, 1999). Outra função relacionada a essa enzima e a produção de fitoalexinas em folhas de *Avena sativa* L, sob estimulação química com N-acetylchitooligosaccharides (ISHIHARA et al., 1998).

Nesta pesquisa pode-se observar a maior expressão de sequencias que estariam relacionadas a síntese de compostos fenólicos, para fortalecimento das paredes celulares corroborando com os resultados obtidos por Sambugaro e colaboradores (2004) e Garcia (1995), que propuseram que o fortalecimento das barreiras físicas através de deposição de compostos fenólicos e da lignificação destas, seria um dos principais mecanismos de contenção do patógeno e de sua incapacitação de causar lesão estromática.

#### 5.4. Perspectivas

Para melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação *Hevea brasiliensis* – *Microcyclus ulei*, os estudos de expressão gênica devem ser continuados através da utilização de macroarranjos de alta densidade, que possibilitariam uma maior visibilidade do perfil gênico em determinada condição, visto que esses macroarranjos conteriam todo conjunto de transcritos identificados nas bibliotecas subtrativas e não apenas de alguns grupos funcionais como os aqui apresentados.

Para identificação de quais seqüências encontradas nas bibliotecas são pertencentes a planta e ao fungo, deve-se construir bibliotecas do *Microcyclus ulei* e realizar confronto via ferramentas de bioinformática entre as seqüências dessa nova biblioteca e as obtidas nas bibliotecas subtrativas.

Para um melhor entendimento do perfil de expressão gênica de algumas seqüências que se destacaram nesse estudo, dentre elas subtilase e hydroxycinnamoyl-CoA transferase, aplicá-las a técnica de PCR em tempo real, que possibilitaria um perfil de expressão a nível quantitativo e um melhor entendimento do seu papel na interação.

## 6. CONCLUSÕES

- Existem diferenças qualitativas e quantitativas de expressão gênica entre as cultivares MDF 180 e PB 314 inoculadas com *M.ulei*, porém novos estudos devem ser realizados, visando gerar confiabilidade estatística que sustente essa afirmação.
- Foram identificadas 69 seqüências diferentemente expressas na biblioteca resistente e 4 na biblioteca suscetível o que nos possibilita sugerir que um sistema de reconhecimento ao patógeno mais efetivo na cultivar MDF 180.
- A técnica de macroarranjos com marcação quimiluminescência é uma alternativa robusta, segura e pouco dispendiosa para análise da expressão gênica em larga escala, porém a ausência de repetições impedem a existência de confiabilidade estatística neste método.
- A resistência observada no MDF 180 é baseada em um efetivo sistema de sinalização mediada por MAPK e pelo constante fortalecimento dos tecidos vegetais através da síntese e deposição de compostos fenólicos.
- As seqüências da Subtilase e da Hydroxycinnamoyl-CoA transferase, são observadas apenas na biblioteca SSH 4-28 dai e tem significativo aumento na expressão gênica 10 dai em relação a cultivar suscetível, o que as torna interessantes objetos para estudos funcionais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITCH, R.B. and MARTIN, G.B. (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Current Opinion Plant Biology**. 7, 356–364.

ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome Project. **Science**, v.252, 1651-1656. 1991.

BAKER, C.J. and ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology** 33:299-321. 1995.

BALDWIN, D.; CRANE, V.; RICE, D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. v.2, p.96-103 1999.

BELKHADIR Y, SUBRAMANIAM R.; DANGL JL. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**. 7: 391–399. 2004.

BEZEMER TM, WAGENAAR R, VAN DAM NM, WACKERS FL: Interactions between above- and belowground insect herbivores as mediated by the plant defense system. **Oikos**. 101:555-562. 2003.

BIRCH, P.R.J and KAMOUN, S. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant–microorganism interactions. **New technologies for life sciences: A Trends Guide**. p.77-82. 2000.

BREUSEGEM, F.V.; INZÉ, D.; VRANOVÁ, E. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, No. 372, p.1227-1236, 2002.

BRUCE, T.J.A. and PICKETT, J.A. Plant defence signalling induced by biotic attacks. **Current Opinion in Plant Biology**. 10:387–392. 2007

CHANG, J.H., GOEL, A.K., GRANT, S.R. and DANGL, J.L. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. 7, 11–18. 2004.

CHEE KH, HOLLIDAY P. South American leaf blight of Hevea Rubber. Malaysian Rubber Research and Development Board. Malaysian. **Rubber Research and Development Board Monograph** No. 13, 50 pp. 1986.

CLÉMENT-DEMANGE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M.; CARRON, M. LE GUEN, V.; CHAPUSET, T.; NICOLAS, D. Rubber tree. p.455-480. . In CHARRIER et al.; **Tropical plant breeding**. 561pag. Editions Quae 2001.

COSTA, R.B.; GONÇALVES, P.S.; ODALIA-RÍMOLI, A.; ARRUDA, E.J. Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da seringueira (*Hevea* sp). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v1; n2; 51-58; 2001.

CRAMER, R. and LAWRENCE, C.B. Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in planta during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Fungal genetics and Biology**. Vol 41, pag 115 – 128. 2004.

DABBAS, K. M. et al. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaaldadura da folha. **Summa Phytopathology**, v. 32, n. 4, p. 328-338, 2006.

DANGL, J.L. & JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, 411:826-833. 2001.

DAT, J; VANDENABELLE, S; VRANOVÁ, E; VAN MANTAGNU, V; INZÉ, D; VAN BREUSEGEM, F; Dual action of oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, v 57, p 779-795, 2000.

DE RISI, J.; VISHWANATH, R.L.; BROW, P.D. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression in a genomic scale. *Science*. v.278, p680-686. 1997.

DENBY, K.J.; KUMAR, P.; KLIEBENSTEIN, D.J. Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. v.38. p.473-486. 2004

DESENDER, S.; ANDRIVON, D.; VAL, F. Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? **Cellular Microbiology**. v. 9. 21-30. 2007

DIATCHENKO, L., LAU, Y.F.C., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, L., LUKYANOV, L., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E.D. and SIEBER, P. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 93, 6025–6030. 1996.

DUGGAN, D.J.; BITINER M.; YI-DONG, C.; MELTEZER, P.; TRENT, J.M. expression profiling using cDNA microarrays. **Supplement to Nature Genetics**. v.21. p10-14. 1999.

DURRANT, W.E. and DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 42:185–209. 2004

ESPINOSA, A. and ALFANO, J.R. (2004) Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. **Cell. Microbiol.** 6, 1027–1040.

EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.L.H.; WINN, M.E.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; COUSSENS, P.M.; IRELAND, J.J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. **In press in Biology of Reproduction**, 2004.

FELIX, J.M.; DRUMMOND, R.D.; NOGUEIRA, F.T.S.; ARRUDA, P.; MENOSSE, M. Genoma funcional. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 24. p.60-67. 2002

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BOM, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X. and NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**. 5, 527–536. 2004.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu Rev Phytopath.** 9: 275–296. 1971

FURTADO, E. L. Manejo do Mal-das-folhas da seringueira no Brasil. **Informe Agropecuário**. v. 28, n. 237, p 88-94. 2007.

GARCIA D, CAZAUX E, RIVANO F, AUZAC JD. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight. *Hevea* spp. **European Journal of Forest Pathology** 25: 282–292. 1995

GARCIA D, TROISPOUX V, GRANGE N, RIVANO R. D'AUZAC J. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. **European Journal of Forest Pathology** 29: 323–338. 1999.



GASPAROTTO, L., FIGUEREDO A. S., REZENDE, J. C. P., ALVES, F.F. **Doenças da seringueira no Brasil. Brasília** : Embrapa-SPI. 168p. 1997.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v.43: 205-227. 2005.

GONÇALVES, P.S.; BORTOLETTO, N.; CARDINAL, A.B.B.; COSTA, B.R.; GOUVEA, L.R.L. Genetic variability and selection for laticiferous system characters in *Hevea brasiliensis*. **Genetics and Molecular Biology**, 28, 3, 414-422. 2005a.

GONÇALVES, P.S.; BORTOLETTO, N.; CARDINAL, A.B.B.; COSTA, B.R.; GOUVEA, L.R.L.; MORAES, M.L.T. Age-age correlation for early selection of rubber tree genotypes in São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 28, 4, 758-764. 2005b.

GONÇALVES, P.S.; MARTINS, A.L.M.; BORTOLETTO, N.; SAES, L.A. Selection and genetic gains for juvenile traits in progenies of *Hevea* in São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 27, 2, 207-214. 2004.

GOVRIN, E. and LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**. 10: 751–757. 2000.

GU, K.; YANG, B.; TIAN, D.; WU, L.; WANG, D.; SREEKALA, C.; YANG, F.; CHU, Z.; WANG, G.; WHITE, F.F.; YIN, Z. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. **Nature**, v.435|23. p.1122-1125. 2005.

GUILLEROUX M.and OSBOURN A. Gene expression during infection of wheat roots by the 'take-all' fungus *Gaeumannomyces graminis*. **Molecular Plant Pathology**. v.5. 203-216. 2004

HAMMOND-KOSACK, K. & JONES, J.D.G. Response to plant pathogens. IN: Biochemistry and Molecular Biology of Plants, ed. Buchanan, B.; GRUISSEM, D. and JONES, R. pp. 1102–56. Rockville, MD: **American Society of Plant Physiologists**. 2000

JUNQUEIRA, N.T.V. **Variabilidade fisiologica de Microcyclus ulei (P.Henn.) v. Arx**. Viçosa. 1984. 134p. Tese de Doutorado.

JUNQUEIRA N.T.V.; CHAVES G.M.; ZAMBOLIM L; ALFENAS, A.C.; GASPAROTTO L. Reação de clones de seringueira a varios isolados de Microcyclus ulei. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 23: 877–893. 1988.

JUNQUEIRA N.T.V; LIEBEREI, R; KALIL FILHO A.N.; LIMA M.I.P.M.. Components of partial resistance in Hevea clones to rubber tree leaf blight, caused by Microcyclus ulei. **Fitopatologia Brasileira** 15: 211–214. 1990

HALLE, F.; OLDEMAN, R.A. TOMLINSON, P.B. 1978. **Tropical trees and forest**. Berling. Springer-Verlag, 441.

HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48:575-607. 1997.

HAMMOND-KOSACK, K.E. & PARKER, J.E. Deciphering plantpathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, 14:177–193. 2003

HAMMOND-KOSACK, K.E. and JONES J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, 8: 1773-1791.1996.

HEGEDUS, A., ERDEI, S. & HORVÁTH, G. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**. 160:1085-1093. 2001.

HOLLIDAY, P. South American leaf blight (*M. ulei*) of *Hevea brasiliensis*. Commonwealth Mycological Institute. **Phytopathology Papers** 12:1-31. 1970.

HOLUB, H.E. Evolution of parasitic symbioses between plants and filamentous microorganisms. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9:397–405. 2006.

HULBERT, S.H., WEBB, C.A., SMITH, S.M. & SUN Q. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology**, 39:285-312. 2001.

IDNURM, A. and HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi, **Molecular Plant Pathology**. 2 ( 4 ) , 241–255. 2001.

JACKSON. A.O. and TAYLOR, C.B. Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface. **The Plant Cell**, Vol. 8, 1651-1668. 1996

JONES, D.A. and TAKEMOTO, D. (2004) Plant innate immunity—direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Curr. Opin. Immunol.** 16, 48–62.

KAZAN, K.; SCHENK, P.M.; WILSON, I.; MANNERS, J.M. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**. v.2, 177-185. 2001

KONISHI H, KITANO H, KOMATSU S. Identification of rice root proteins regulated by gibberellin using proteome analysis. **Plant Cell Environmental** 2005;28:328–39.

KOTCHONI, S.O. and GACHOMO, E.W.; The reactive oxygen species networks pathways: n essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. **Journal of Biosciences**, v, 31, n.3, p 391-404, 2006

KRÜGER, .J.; THOMAS, C. M.; DIXON, M. S.; SMOKER, M.; TANG, S.; MULDER, L.; JONES J. D. G. A Tomato Cysteine Protease Required for Cf-2- dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. **Science**. v. 296. (5568), p. 744 – 747. 2002.

KUHN, E. From Library Screening to Microarray Technology: Strategies to Determine Gene Expression Profiles and to Identify Differentially Regulated Genes in Plants. **Annals of Botany**. 87(2):139-155, 2001.

LAM, E; KATO, N; LAWTON, M; Programed Cell Death, Mitochondria and the plant hypersensitivity response. **Nature**. v.411, n.6839, pag. 848-853, 2001.

LEAL Jr, G.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in Theobroma cacao associated with resistance to witches' broom disease caused by Crinipellis pernicioso. **Molecular Plant Pathogen**. 8 ( 3 ) , 279–292. 2007

LE GUEN, V.; LESPINASSE, D.; OLIVER, G.; RODIER-GOUD, M.; PINARD, F.; SEGUIN, M. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei* ) in rubber tree. **Theoretical and Applied Genetics**. 108: 160–167. 2003.

LE GUEN, V.; GARCIA, D.; MATTOS, C.R.R.; DOARE, F.; LESPINASSE, D.; SEGUIN, M. Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. **New phytologist**. 173 : 335–345. 2007.

LE GUEN, V.; GUYOT, J.; MATTOS, C.R.R.; SEGUIN, M.; GARCIA, D. Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. **Crop Protection**. In press. 2008

LESPINASSE, D.; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M.; TROISPOUX, V. Identification of QTLs involved in the resistance of South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. **Theoretical and Applied Genetic**. 100 : 975-984. 2000.

LESPINASSE, D.; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. **Theoretical Applied Genetics**. 100:127–138. 1999.

LIANG, R. AND PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, 257, 967-971. 1992.

LIBEREI, R. South american leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): New steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany** 1–18, 2007

LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 44:135–62. 2006.

LÓPEZ, E.S.; BRONSTEIN, P.A.; SCHNEIDER, A.; COLLMER, A. HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. **Molecular Microbiology**. v 54. p 353-365. 2004.

MAOR, R. and SHIRASU, K. The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8:399–404. 2005.

MARTIN G.B., BOGDANOVE, A.J. & SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biolology**, 54:23–61. 2003.

MARTIM, J.B. Functional analysis of disease resistance gene and their downstream effectors. **Current. Opinion in Plant Biology** v.2 p.273-279, 1999.

MATTOS, C. R. R., GARCIA, D., PINARD, F., Le GUEN, V. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**. 28. 502-507. 2003.

McCLELLAND, M., MATHIEU-DAUDE, F., WELSH, J. RNA fingerprint and differential display using arbitrarily primed PCR. **TIG**, 11: 242-246. 1995.

**MOGENSEN, O.V.**; BAHRUN, A.; JENSEN, C.R.; ASCH, F. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, Vol. 53, No. 367, pp. 251-263, **2002**

MOODY, D.; ZOU, Z;MCYNTIRE, L. Cross-specie hybridization of pig RNA to human nylon microarrays. **BMC Genomics**, v.3. p.108-116, 2000.

MORRISSEY, J.P. and OSBOURN, A. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews**. Vol. 63, No. 3. p. 708–724. 1999

MYSORE, K.S. and RYU, C.M. (2004) Nonhost resistance: how much do we know? **Trends Plant Science**. 9, 97–104.

NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT III, B.F. & DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review in Genetic**, 37: 579-609. 2003.

NÜRNBERGER, T. and LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathogen**. 6 ( 3 ) , 335–345. 2005.

ODDS, F. C.; Gow, N.A.R.; BROWN, A.J.P. Fungal virulence studies come of age. **Genome Biology**, 2(3):reviews1009.1–1009.4. 2001.

OMOKHAFE, K. O. Interaction between flowering pattern and latex yield in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Vol. 4 (3), 280-284.2004

**PARK, S.; BAIS, H.B.; WEIR, T.L.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M.** How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**. v 9, Issue 1, Pages 26-32. 2004.

QURESHI, M.I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, v.164. 1239-1260. 2007.

RICHTER, T.E. and RONALD, P.C. The evolution of disease resistance genes. **Plant Molecular Biology**. 42: 195–204, 2000.

Sambugaro, R.; Furtado, D.L.; Rodella, R.A.; Mattos, C.R.R. Anatomia foliar de seringueira (*Hevea* spp.) e desenvolvimento da infecção por *Microcyclus ulei*. **Summa Phytopathologica** 30(1): 51-56. 2004.

SCHEIDELER, M.; SCHLAICH, N.L.; FELLENGERG, K.; BEISSBARTH, T.; HANSER, N.C.; VINGRON, M.; SLUSLARENKO, A.J.; HOHEISEL, J.D. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. **Journal of Biological Chemical**, v277; 10555-10561; 2002.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with um complementary DNA microarray. **Science**. v.270, p.467-470. 1995.

SINGH, J. S.; RAGHUBANSHI, A. S.; SINGH, R. S.; SRIVASTAVA, S. C. Microbial biomass acts as a source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna. **Nature**, 338, 499 – 500. 1989.

STASKAWICZ, B.; AUSUBEL, F.; BAKER, B.; ELLIS, J; JONES, J. 'Molecular genetics of plant disease resistance' **Science**, vol. 268, pp. 661-667, 1995.

TAKKEN, F.L.W. & JOOSTEN, M.H.Q.J. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 699–713. 2000.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6(4):351-357. 2003.

ULE E..Kautschukgewinnung und Kautschukhandel AM **Amazonen-Strome. Tropenpflanzer** 6: 1–71. 1905

VAN BAARLEN, P.; WOLTERING, E.J.; STAATS, M.; VAN KAN, J.A.L. Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. **Molecular Plant Pathology**. v.8. p.41-48. 2007

VAN DAM NM, RAAIJMAKERS CE, VAN DER PUTTEN WH: Root herbivory reduces growth and survival of the shoot feeding specialist *Pieris rapae* on *Brassica nigra*. **Entomology Experimental Applied**. 115:161-170. 2005.

VAN LOON LC and VAN STRIEN EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathology**. 55:85–97

VELCULESCU V.E.; ZHANG L.; VOGELSTEIN B.; KINZLER K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**. 270: 484–487.1995



VOS, R.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN de LEE, R.; HOMES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new concept for DNA Fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23, 4407-4414. 1995.

WAN, J.; Dunning, M.F.; Bent, A.F. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. **Functional & Integrative Genomics**. v.2, 259-273. 2002

WANG, Z.; TARAMINO, G.; YANG, D.; LIU, G.; TINGEY, S.D.; MAIO, G. H. e WANG, G.L. Rice ESTs disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. **Mol. Genet. Genomics**. v.245, p302-310, 2001.

**WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**. v. 9, p.244-252. 2004.

WHITE, F.F., YANG, B. AND JOHNSON, L.B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Curr. Opin. Plant Biol.** 3, pp. 291–298. 2000.

WISE, R.P.; MOSCOU, M.J.; BOGDANOVE, A.J.; WHITHAM, S.A. Transcript Profiling in Host–Pathogen Interaction. **Annual Rev. Phytopathol.** v.45, 329–369. 2007.

WOHLGEMUTH, H., MITTELSTRASS, K., KSCHIESCHAN, S., BENDER, J., WEIGEL, H.J., OVERMYER, K., KANGASJARVI, J., SANDERMANN, H. & LANGEBARTELS, C. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant. **Plant Cell & Environment**. 25:717-723. 2002.

WRZACZEK, M. AND HIRT H. Plant MAP kinase pathways: how many and what for? **Biology of the Cell** 93. 81–87. 2001.

XU, J.; PENG, Y.; DICKMAN, M.B.; SHARON, A. The dawn of fungal pathogen Genomics. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.44. 337–366.2006.

**YAMAMIZO, C.; KUCHIMURA, K.; KOBAYASHI, A.; KATOU, S.; KAWAKITA, K.; JONES, J.D.G. DOKE, N.; YOSHIOKA, H.** Rewiring Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade by Positive Feedback Confers Potato Blight Resistance. **Plant Physiology Preview.** 11, 2006; 10.1104/pp.105.074906. 2006

YANG, C. and GONG, Z. Purification and characterization of an ethylene-Induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*). **Protein Expression and Purification.** 24, 76–82. 2002.

YANG, Y.H., DUDOIT, S., LUU, P., LIN, D.M., PENG, V., NGAI, J. E SPEED, T.P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method 313 addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acid Res.**30: e15.